



REC'D 04 FEB 2004
WIPO PCT

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung

PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Aktenzeichen: 102 56 381.0

Anmeldetag: 02. Dezember 2002

Anmelder/Inhaber: BASF Aktiengesellschaft, Ludwigshafen/DE

Bezeichnung: L-Rhamnose-induzierbare Expressionssysteme

IPC: C 12 N 15/70

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 1. Dezember 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Letang

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

Patentansprüche

1. Verfahren zur Expression von Nukleinsäuresequenzen in prokaryontischen Wirtszellen, wobei man
 - a) mindestens ein in besagten Wirtszellen episomal replizierbares, DNA-Konstrukt umfassend eine zu exprimierende Nukleinsäuresequenz unter transkriptioneller Kontrolle eines L-Rhamnose-induzierbaren Promotors, wobei besagter Promotor in Bezug auf besagte Nukleinsäuresequenz heterolog ist, in besagte Wirtzellen einbringt und
 - b) prokaryontischen Wirtszellen selektioniert, welche besagtes DNA-Konstrukt in episomaler Form enthalten und
 - c) die Expression besagter Nukleinsäuresequenz durch Zugabe von L-Rhamnose zu einer Kultur besagter selektionierter Wirtzellen induziert,dadurch gekennzeichnet, dass die prokaryontische Wirtszelle zumindest defizient ist in Bezug auf L-Rhamnose-Isomerase.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die prokaryontische Wirtzelle ausgewählt ist aus den Arten der Familie der Enterobacteriaceae oder der Ordnung Actinomycetales.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei die prokaryontische Wirtzelle Escherichia coli ist.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der L-Rhamnose-induzierbare Promotor der rhaBAD-Promotor aus E. coli oder ein funktionelles Äquivalent desselben oder ein funktionell äquivalentes Fragment der vorgenannten ist.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der L-Rhamnose-induzierbare Promotor zumindest ein RhaS-Bindeelement gemäß SEQ ID NO: 5 oder ein funktionelles Äquivalent desselben oder ein funktionell äquivalentes Fragment der vorgenannten enthält.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei der L-Rhamnose-induzierbare Promotor mindestens eine Sequenz beschrieben durch SEQ ID NO: 1, 2, 3 oder 4 enthält.



2

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die L-Rhamnose-Isomerase durch die Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 9 oder ein funktionelles Äquivalent derselben beschrieben ist.
- 5 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei das episomally replizierbare DNA-Konstrukt eine Größe von maximal 100000 Basen bzw. Basenpaaren hat.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei das episomally replizierbare DNA-Konstrukt ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus zirkulären Plasmidvektoren, Phagemiden und Cosmiden.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die prokaryontische Wirtszelle mindestens eine weitere Defizienz in Bezug auf ein Gene aufweist, das eine Funktion der Rhamnose-Metabolisierung hat, wobei besagtes Gen für ein Protein kodiert ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus der Rhamnulose-1-Phosphatase (RhaB) und der Rhamnulosephosphat-Aldolase (RhaD).
- 20 11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die Expression der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz die Produktion eines durch besagte Nukleinsäuresequenz kodierten Proteins bedingt.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei die zu exprimierende Nukleinsäuresequenz für ein rekombinantes Protein kodiert ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Chymosinen, Proteasen, Polymerasen, Saccharidasen, Dehydrogenasen, Nukleasen, Glucanasen, Glucoseoxidases, α -Amylasen, Oxidoreduktasen, Peroxidasen, Laccasen, Xylanasen, Phytasen, Cellulinasen, Collagenasen, Hemicellulinasen, Lipasen, Lactasen, Pectininasen, Amiloglucosidasen, Glucoamylasen, Pullulanasen, Glucuronidasen, Nitrilasen, Collagenasen, Cellulasen, Serumalbuminen, Faktor VII, Faktor VIII, Faktor IX, Faktor X, Gewebeplasminogenfaktoren, Protein C, von Willebrand-Faktoren, antiThrombinen, Erythropoietinen, "Colony Stimulating Factors", Cytokinen, Interleukinen, Insulinen, Integrine, Addressine, Selectinen, Antikörpern, Antikörperfragmenten, Strukturproteinen, Collagen, Fibroinen, Elastinen, Tubulinen, Actinen, Myosinen, Wachstumsfaktoren, Zellzyklusproteinen, Impfstoffen, Fibrinogenen und Thrombinen.
- 45 13. Prokaryontische Wirtszelle, die zumindest defizient ist in Bezug auf L-Rhamnose-Isomerase und mindestens ein in besagter Wirtszelle replizierbares DNA-Konstrukt enthält, welches eine

3.

zu exprimierende Nukleinsäuresequenz unter transkriptioneller Kontrolle eines durch L-Rhamnose-induzierbaren Promoters umfaßt, wobei besagter Promotor in Bezug auf besagte Nukleinäuresequenz heterolog ist.

5

14. Verwendung einer prokarontischen Wirtszellen nach Anspruch 13 zur Herstellung von Nahrungs- oder Futtermitteln, Enzymen, Chemikalien, Pharmazeutika oder Feinchemikalien.

- 10 15. Verfahren zur Herstellung von rekombinanten Proteinen, Enzymen und Feinchemikalien unter Einsatz einer prokaryontischen Wirtszellen gemäß Anspruch 13 oder einer Präparationen der selben.

15

20

25

30

35

40

45

L-Rhamnose-induzierbare Expressionssysteme

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Expression von Nukleinsäuresequenzen in prokaryontischen Wirtszellen, wobei man mindestens ein in besagten Wirtszellen episomal replizierbares DNA-Konstrukt umfassend eine zu exprimierende Nukleinsäuresequenz unter transkriptioneller Kontrolle eines L-Rhamnose-induzierbaren Promotors, wobei besagter Promotor in Bezug auf besagte Nukleinsäuresequenz heterolog ist, in besagte Wirtszellen einbringt und die Expression besagter Nukleinsäuresequenz durch Zugabe von L-Rhamnose induziert, dadurch gekennzeichnet, dass die prokaryotische Wirtszelle zumindest defizient ist in Bezug auf eine L-Rhamnose-Isomerase. Die Erfindung betrifft ferner prokaryotische Wirtszellen, die zumindest defizient sind in Bezug auf eine L-Rhamnose-Isomerase und mindestens ein in besagter Wirtszelle replizierbares DNA-Konstrukt enthalten, welches eine zu exprimierende Nukleinsäuresequenz unter transkriptioneller Kontrolle eines durch L-Rhamnose-induzierbaren Promotors umfasst, wobei besagter Promotor in Bezug auf besagte Nukleinsäuresequenz heterolog ist.

Die heterologe Expression von Genen ist eine ökonomische Möglichkeit, Enzyme und andere Proteine für pharmazeutische und industrielle Verwendungszwecke herzustellen. Besagte Expressionen werden nach wie vor überwiegend mit Stämmen von Escherichia coli realisiert. Zur Herstellung rekombinanter Proteine sind eine Vielzahl von Systemen bekannt, die sich unterschiedlicher Wirtszellen und Genexpressionskassetten bedienen. Obgleich zahlreiche Systeme und Verfahren zur Expression rekombinanter Proteine in mikrobiellen Systemen beschrieben sind, basieren die Expressionssysteme für gram-negative Bakterien wie Escherichia coli auf einem sehr limitierten Repertoire bakterieller Promotoren. Am verbreitesten sind der Laktose-Promotor [lac] (Yanisch-Perron et al. (1985) Gene 33: 103-109) und der Tryptophan-Promotor [trp] (Goeddel et al. (1980) Nature (London) 287: 411-416) sowie Hybridgetpromotoren der vorgenannten [lac und trc] (Brosius (1984) Gene 27:161-172; Amanna & Brosius (1985) Gene 40: 183-190). Weitere Beispiele sind die Promotoren PL und PR des λ -Phagen (Elvin et al. (1990) Gene 37:123-126), der Phage T7-Promotor (Tabor & Richardson (1998) Proc Natl Acad Sci USA 82:1074-1078) und der Promotor der alkalischen Phosphatase [pho] (Chang et al. (1986) Gene 44:121-125).

Mit der heterologen Expression sind verschiedene Probleme wie beispielsweise die Toxizität des Genproduktes, zu geringe Expressionsraten oder Bildung von unlöslichen Proteinaggregaten

("inclusion bodies") verbunden. Viele der oben beschriebenen Promotoren sind für Anwendungen ungeeignet, bei denen das zu exprimierende rekombinante Proteine eine toxische Wirkung auf den jeweiligen Wirt hat. In diesen Fällen ist eine möglichst strikte Regulation der Expression wünschenswert. Dazu können sogenannte induzierbare Promotorsysteme eingesetzt werden, die mittels Zugebung eines Induktors oder eines anderen exogenen Stimulus (z.B. Hitze) induziert werden können. Besagte induzierbare Promotorsysteme bestehen in der Regel aus einer Promotor/Regulator-Kombination, wobei der Regulator beispielsweise ein Protein darstellt, welches in Kombination mit einem exogenen Stimulus die Transkription ausgehend von dem entsprechenden Promotor induziert. Beispielhaft zu nennen ist die Kombination eines Promotors mit einem Repressor wie z.B. dem lac-Repressor (Studier FW et al. (1990) J. Mol. Biol. 219:45-59). Die reprimierende Wirkung dieses Repressor kann durch Zugabe eines natürlichen Induktors (z.B. Laktose) oder eines künstlichen Induktors (z.B. Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid; IPTG) aufgehoben und die Expression so initiiert werden. IPTG kann im Gegensatz zu Laktose nicht verstoffwechselt werden und gewährt so eine langanhaltende Induktion. Ein weiteres Beispiel für diese induzierbaren Promotoren ist der durch Arabinose induzierbare araB Promotor (US 5,028,530; Guzman LM et al. (1995) J. Bacteriol. 177:4121-4130).

IPTG und andere synthetische Induktoren sind sehr teuer und wirken sich teilweise nachteilig auf das Wachstum der Organismen aus, was eine Anwendung im großindustriellen Maßstab unrentabel macht.

Physiologische Induktoren wie Aminosäuren (z.B. Tryptophan) und Zucker (Arabinose) sind in der Regel zwar billiger, werden aber vom Organismus verstoffwechselt, so dass sie in einer Zellanzucht, insbesondere bei Hochdichtezellfermentationen, in erheblichen Mengen hinzugefügt und/oder nachträglich zudosiert werden müssen. Außerdem können Metaboliten dieser Verbindungen auch schädlich für die weitere Anzucht sein, z.B. bei der Entstehung von Acetat aus Zuckern.

WO 01/73082 beschreibt ein Verfahren zur Expression rekombinanter Proteine unter Kontrolle des induzierbaren araB Promotors in einem E.coli Wirtsorganismus, der eine Defizienz für den aktiven Transport des Induktors Arabinose aufweist. Als Vorteil wird hier geltend gemacht, dass kein aktiver Transport sondern lediglich passiver Transport (durch Diffusion) stattfinden kann. Dadurch kann die intrazellulare Arabinose-Konzentration und somit auch die Expressionsinduktion besser kontrolliert werden. In einigen

der aufgeführten Beispiele wird ein E.coli Stamm (E104) eingesetzt, der eine Defizienz in den Arabinose-metabolisierenden Enzymen Ribulokinase (AraB) und L-Ribulose-5-phosphat-4-Epimerase (AraD) aufweist. Gemäß den Expressionsdaten hat diese Defizienz jedoch keine wesentliche Auswirkung auf die Expressionshöhen. Das Arabinose-induzierbare System hat verschiedene Nachteile:

- a) Arabinose hat bereits ab Konzentrationen von größer 0,1 mM einen wachstumshemmenden Effekt auf die Bakterienkultur, der auch mit dem in WO 01/73082 beschriebenen Verfahren nur bedingt kompensiert werden kann (vgl. Tabelle 4, WO 01/73082).
 - b) Der Arabinose-induzierbare Promotor ist in Abwesenheit von Arabinose nicht gänzlich inaktiv, sondern besitzt eine recht hohe Basisaktivität (vgl. Tabelle 5, WO 01/73082).
 - c) Die Qualität der exprimierten rekombinanten Proteine ist abhängig von der Zelldichte und nimmt mit zunehmenden Zelldichten ab (De Lisa MP et al. (1999) Biotechnol Bioeng 65:54-64).
- Beschrieben ist der Escherichia coli Stamm JB1204 (CGSC6999, Bulawa & Raetz (1984) J Biol Chem 259:11257-11264), der die Transposoninsertion "rha-14::Tn10" aufweist, wobei zur Sequenz oder Funktion von "rha-14" keine genaueren Angaben gemacht werden.

Die Ausnahme und Verstoffwechslung von L-Rhamnose in Bakterien wie E.coli ist beschrieben. L-Rhamnose wird über ein aktives Transportsystem (RhaT) in die Zellen aufgenommen, mit einer Isomerase (RhaA) in L-Rhamnulose überführt, die dann weiter durch die Rhamnulose-1-Phosphatase (RhaB) phosphoryliert und durch eine Aldolase (RhaD) zu Dihydroxyacetophenophat und Lactaldehyd hydrolysiert wird. Die Gene rhaBAD bilden ein Operon und werden mit Hilfe des sogenannten rhaP_{BAD}-Promotors transkribiert. Das Rhamnosystems zeichnet sich gegenüber anderen Systemen dadurch aus, dass zwei Aktivatoren RhaS und RhaR zur Regulation erforderlich sind. Beide bilden eine Transkriptionseinheit und werden entgegengesetzt zu rhaBAD transkribiert. In Anwesenheit von L-Rhamnose bindet RhaR an den rhaP_{Rs}-Promotor und initiiert seine eigene Expression als auch die RhaS-Expression. RhaS wiederum bindet nach Aktivierung durch L-Rhamnose als Effektor an den rhaP_{BAD}-Promotor und den separaten rhaP_T-Promotor des rhaT-Gens und aktiviert die Transkription der Strukturgene (Moralejo P et al. (1993) J Bacteriol 175:5585-5594; Tobin JF et al. (1990) J Mol Biol 211:1-4; Chen YM et al. (1987) J Bacteriol 169:3712-3719; Egan SM et al. (1993) J Mol Biol 243:87-98). Die Kombination zweier Aktivatoren bedingt eine ungewöhnlich strikte Expressionskontrolle.

durch den rhaBAD-Promotor. Ein Vergleich des Arabinose-induzierbaren araB-Promotors und des Rhamnose-induzierbaren rhaBAD-Promotor zeigt, dass letzterer wesentlich strikter reguliert ist und in Abwesenheit des Induktors Rhamnose quasi einen Null-Phänotyp
5 repräsentiert (Haldimann A et al. (1998) J Bacteriol 180(5):1277-1286).

WO 01/32890 beschreibt die Herstellung von L-Pantolacton-Hydro-lase mit Escherichia coli TG1 pDHE681 bzw. Derivaten, wobei
10 L-Rhamnose als Induktor für die Genexpression des Enzyms eingesetzt wird. Da L-Rhamnose von E. coli gut verstoffwechselt wird, muß die umgesetzte L-Rhamnose durch Zufütterung nachgeführt werden. Dies bedeutet einen erheblichen experimentellen Aufwand und erhöht die Kosten für das Anzuchtmedium.

15 Beschrieben sind ferner Expressionssysteme zur Fermentation unter hohen Zelldichten unter Verwendung des L-Rhamnose-induzierbaren rhaBAD-Promotors und eines E.coli Stamm, der eine gezielt-eingeführte Defizienz in der L-Rhamnulosekinase (rhaB) aufweist
20 (Stumpf T et al. (2000) Biospectrum 6(1):33-36; Wilms B et al. (2001) Biotechnol Bioeng 73(2): 95-103). RhaB wurde hier bewußt ausgewählt, da es der erste irreversible Schritt der Metabolisierung von L-Rhamnose ist (vgl. Wilms B et al. (2001) Biotechnol Bioeng 73(2) S.98, linke Spalte, Z.4-8). Eine optimale Induktion
25 kann in diesen System mit L-Rhamnose-Konzentrationen von 2 g/L erreicht werden (vgl. Wilms B et al. (2001) Biotechnol Bioeng 73(2) S.102, linke Spalte, 2. Absatz Z.1-4). Diese Konzentrationen sind immer noch sehr hoch. Bei einem durchschnittlichen Preis von ca. 100 €/kg L-Rhamnose würden bei einem 10 m³ Fermenter noch
30 Kosten von 2000 € nur für die L-Rhamnose anfallen.

Beschrieben sind ferner eng-regulierte Rhamnose-induzierbare Expressionssysteme, bei denen mittels homologer Rekombination das hinter dem endogenen rhaBAD-Promotor lokalisierte Rhamnose-Operon
35 (BAD) gegen das PhoB-Gen (Transkriptionsaktivator) ausgetauscht wurde (Haldimann A et al. (1998) J Bacteriol 180(5):1277-1286). Das hier beschriebene System ist zwar gut geeignet, um Regulatorstudien zu betreiben, da eine sehr enge Regulation gewährleistet ist. Es ist jedoch zur Überexpression - insbesondere unter hoch-dichten Zellkulturbedingungen - wenig geeignet, da - aufgrund des Austausches des chromosomalen Rhamnose-Operons - jeweils nur eine Kopie der rhaBAD-Promotor gesteuerten Expressionsskassette eingebracht werden kann. Ferner ist der Austausch von Genen mittels homologer Rekombination aufwendig und erfordert eine mühsame
40 Selektion und Charakterisierung entsprechend modifizierter Orga-
45

nismen. Dies macht das beschriebene Verfahren untauglich für den Routineeinsatz.

Es stellte sich die Aufgabe, ein verbessertes Verfahren für die Expression von Nukleinsäuren - und bevorzugt rekombinannten Proteinen - bereitzustellen, was mit geringen L-Rhamnose-Mengen hohe Expressionspiegel ergibt. Diese Aufgabe wird durch die vorliegende Erfindung gelöst.

10 Ein erster Gegenstand der Erfindung betrifft Verfahren zur Expression von Nukleinsäuresequenzen in prokaryontischen Wirtszellen, wobei man

a) mindestens ein in besagten Wirtszellen episomal replizierbares, DNA-Konstrukt umfassend eine zu exprimierende Nukleinsäuresequenz unter transkriptioneller Kontrolle eines L-Rhamnose-induzierbaren Promotors, wobei besagter Promotor in Bezug auf besagte Nukleinsäuresequenz heterolog ist, in besagte Wirtszellen einbringt und

20 b) prokaryontischen Wirtszellen selektioniert, welche besagtes DNA-Konstrukt in episomaler Form enthalten und
25 c) die Expression besagter Nukleinsäuresequenz durch Zugabe von L-Rhamnose zu einer Kultur besagter selektionierter Wirtszellen induziert.

dadurch gekennzeichnet, dass die prokaryontische Wirtszelle zumindest defizient ist in Bezug auf L-Rhamnose-Isomerase.

30 In einer bevorzugten Ausführungsform bedingt die Expression der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz die Produktion eines durch besagte Nukleinsäuresequenz kodierten Proteins, so dass das erfundungsgemäße Verfahren zur Herstellung rekombinanter Proteine eingesetzt werden kann.

In einer weiterhin bevorzugten Ausführungsform kann eine zusätzliche Defizienz in einem oder mehreren weiteren L-Rhamnose-metabolisierenden bzw. transportierenden Proteinen vorliegen.

40 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft eine prokaryontische Wirtszelle, die zumindest defizient ist in Bezug auf L-Rhamnose-Isomerase und mindestens ein in besagter Wirtzelle replizierbares DNA-Konstrukt enthält, welches eine zu exprimierende Nukleinsäuresequenz unter transkriptioneller Kontrolle eines

durch L-Rhamnose-induzierbaren Promotors umfaßt, wobei besagter Promotor in Bezug auf besagte Nukleinsäuresequenz heterolog ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform kann die erfindungsgemäße 5 prokaryontische Wirtszelle eine zusätzliche Defizienz in einem oder mehreren weiteren L-Rhamnose-metabolisierenden bzw. trans- portierenden Proteinen vorliegen.

Ausserdem betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung 10 von Herstellung von rekombinanten Proteinen, Enzymen und anderen Feinchemikalien wie beispielweise chiraler Carbonsäuren unter Einsatz einer der erfindungsgemäßen prokaryontischen Wirtszellen oder einer Präparationen derselben.

15 Das erfindungsgemäße Verfahren hat verschiedene Vorteile:

1. Es ist einfach anzuwenden, da ausgehend von einem Wirtsstamm durch einfache Transformation der entsprechende Expressionsstamm generiert werden kann, ohne dass eine Insertion mittels 20 homologer Rekombination in das Genom (wie bei Haldimann A et al. (1998) J Bacteriol 180(5):1277-1286) und eine aufwendige Selektion korrekt modifizierter Organismen erforderlich wäre.
2. Die im Rahmen der Erfindung zur Verfügung gestellten Expressionskassetten und -vektoren sind leicht handhabbar. Der beispielhaft eingesetzte rhaP_{BAD}-Promotor hat eine Länge von lediglich 123 Basenpaaren.
3. Da L-Rhamnose, insbesondere bei C-Quellen-limitierten Fermentationen, von E.coli verstoffwechselt wird, entsteht bei Standardverfahren ein hoher Verbrauch von L-Rhamnose (Zufütterung) und damit hohe Mediumskosten. Durch den niedrigen L-Rhamnose-Bedarf des erfindungsgemäßen Verfahrens (<1 % im Vergleich zu L-Rhamnose-metabolisierenden Stämmen) werden die Kosten für das Fermentationsmedium und damit die Biokatalysator-Herstellung erheblich gesenkt. Durch die Bereitstellung des erfindungsgemäßen Verfahrens, ist die Herstellung rekombinanter Proteine (z.B. Nitrilase, L-Pantolacton-Hydrolase) 35 durch Hochdichtezell-Fermentation (z.B. der bereitgestellten E.coli-TG10-Stämme) ohne laufende Rhamnose-Zufütterung möglich.
4. Die Regulation des beschriebenen Systems erwies sich als außergewöhnlich dicht und ergab bereits bei sehr geringen 45 Konzentrationen des Induktors L-Rhamnose von bis zu 0,05 g/l nach wie vor die maximale Induktion, während bei Abwesenheit

des Induktors keinerlei Promotoraktivität detektiert werden konnte. Damit eignet sich das System auch hervorragend für die Expression potentiell toxischer Proteine und ermöglicht eine kostengünstige Produktion insbesondere unter industriellen Bedingungen, da nur geringe L-Rhamnose-Konzentrationen erforderlich sind.

"Prokaryontische Wirtzelle" oder "prokaryontischer Wirtsorganismus" meint im Rahmen dieser Erfindung gram-positive oder gram-negative Bakterien, insbesondere solche gram-positive oder gram-negative Bakterien, die natürlicherweise in der Lage sind L-Rhamnose als Kohlenstoffquelle zu metabolisieren. L-Rhamnose kann von den meisten prokaryotischen Organismen als Kohlenstoffquelle genutzt werden.

15 Bevorzugt meint prokaryontische Wirtzelle oder prokaryontischer Wirtsorganismus alle Gattungen und Arten der Enterobacteriaceae oder Familien und der Ordnung Actinomycetales, ganz besonders bevorzugt die Enterobacteriaceae Arten Escherichia, Serratia, 20 Proteus, Enterobacter, Klebsiella, Salmonella, Shigella, Edwardsielle, Citrobacter, Morganella, Providencia und Yersinia.

Ferner bevorzugt sind die Arten Pseudomonas, Burkholderia, Nocardioides, Acetobacter, Gluconobacter, Corynebacterium, Brevibacterium, 25 Bacillus, Clostridium, Cyanobacter, Staphylococcus, Aerobacter, Alcaligenes, Rhodococcus und Penicillium.

Am meisten bevorzugt sind Escherichia Arten, insbesondere Escherichia coli.

30 "L-Rhamnose-induzierbaren Promotor" meint allgemein all solche Promotoren die in Gegenwart von L-Rhamnose eine höhere Expressionsaktivität aufweisen, als in Abwesenheit von L-Rhamnose. Die Expression ist in Gegenwart von L-Rhamnose mindestens doppelt so hoch, bevorzugt mindestens fünfmal so hoch, ganz besonders bevorzugt mindestens zehnmal so hoch, am meisten bevorzugt mindestens einhundertmal so hoch wie in Abwesenheit von L-Rhamnose. Bevorzugt werden im Rahmen der Ermittlung der Expressionshöhe solche Nukleinsäuresequenzen in funktioneller Verknüpfung mit dem zu prüfenden Promotor eingesetzt, die für leicht quantifizierbare Proteine kodieren. Ganz besonders bevorzugt sind dabei Reporterproteine (Schenborn E, Groskreutz D (1999) Mol Biotechnol 13(1): 29-44) wie "green fluorescence protein" (GFP) (Chui WL et al. (1996) Curr Biol 6:325-330; Leffel SM et al. (1997) Biotechniques 40 23(5):912-8), Chloramphenicoltransferase, Luciferase (Millar et al. (1992) Plant Mol Biol Rep 10:324-414), β -Glucuronidase 45

oder β -Galactosidase.

Dabei kann die Konzentration von L-Rhamnose in dem Medium allgemein in einem Bereich von ungefähr 0,0001 g/l bis ungefähr

5 50 g/l, bevorzugt 0,001 g/l bis 5 g/l, besonders bevorzugt 0,01 g/l bis 0,5 g/l liegen.

Insbesondere bevorzugt ist der rhaBAD-Promotor aus dem L-Rhamnose-Operon rhaBAD in E. coli (Egan & Schleif (1994) J Mol Biol 10 243:821-829), sowie seine funktionellen Äquivalente aus anderen prokaryontischen Organismen, insbesondere Organismen der Enterobacteriaceae Familie.

Ganz besonders bevorzugt sind Promotoren, die mindestens ein 15 RhaS-Bindeelement gemäß SEQ ID NO: 5 oder ein funktionelles Äquivalent desselben als auch ein funktionell äquivalentes Fragment der vorgenannten enthalten.

Insbesondere bevorzugt sind Promotoren die eine Sequenz gemäß 20 SEQ ID NO: 2, 3 oder 4 enthalten sowie funktionelle Äquivalente derselben als auch funktionell äquivalente Fragmente der vorgenannten.

Funktionelle Äquivalente zu einem Promotor umfassend eine Sequenz 25 gemäß SEQ ID NO: 2, 3, 4 oder 5 umfassen bevorzugt solche Promotoren, die

a) im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität wie der Promotor umfassend eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 3, 4 oder 5 aufweisen und

30 b) eine Homologie von mindestens 50 %, bevorzugt 70 %, vorzugsweise mindestens 80 %, besonders bevorzugt mindestens 90 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 95 %, am meisten bevorzugt 99% zu der Sequenz des besagten Promotors aufweisen, wobei sich die Homologie über eine Länge von von mindestens 30 Basenpaaren, bevorzugt mindestens 50 Basenpaaren, besonders bevorzugt von mindestens 100 Basenpaaren erstreckt.

40 Funktionelle Äquivalente zu einem Promotor umfassend eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 3, 4 oder 5 meint insbesondere natürliche oder künstliche Mutationen des besagten Promotors sowie homologe Sequenzen und funktionell äquivalente Sequenzen aus anderen Organismen, bevorzugt aus anderen prokaryontischen Organismen, insbesondere Organismen der Enterobacteriaceae Familie, die im wesent-

lichen die gleiche Promotoraktivität wie der besagte Promotor aufweisen.

"Im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität" meint die Induzierbarkeit der Expressionsaktivität durch L-Rhamnose nach der oben gegebenen allgemeinen Definition für L-Rhamnose-induzierbaren Promotoren.

Wie oben beschrieben, bindet das RhaR-Protein in Anwesenheit von 10 L-Rhamnose an den *rhaP_{RS}*-Promotor und initiiert seine eigene Expression als auch die RhaS-Expression. RhaS wiederum bindet mit L-Rhamnose als Effektor an den *rhaP_{BAD}*-Promotor und aktiviert dann den *rhaP_{BAD}*-Promotor und somit die Transkription der durch besagten Promotor regulierten Nukleinsäuresequenzen. Dieser vorgesetzte Regulationsapparat - bestehend aus RhaR, RhaS und dem *rhaP_{RS}*-Promotor - können durch den prokaryotischen Wirtsorganismus natürlicherweise bereitgestellt, durch gentechnische Verfahren in dessen Genom insertiert oder aber mittels des im Rahmen der Erfindung eingesetzten DNA-Konstruktes zur Verfügung gestellt werden. Eine in diesem Zusammenhang geeignete Promotorkassette ist 20 die durch SEQ ID NO: 1 beschriebene Sequenz.

Sollte die für die Induktion in die Zelle erforderliche L-Rhamnose Aufnahme nicht ausreichen, kann es vorteilhaft sein in Organismen, die beispielsweise natürlicherweise keinen L-Rhamnose-Transporter exprimieren, diesen transgen zur Expression zu bringen. Bisherige Erfahrungen zeigen jedoch das der aktive Rhamnose-transport keine limitierende Größe für die Effizienz des erfindungsgemößen Expressionssystems darstellen sollte.

30 "L-Rhamnose-Isomerase" meint allgemein alle solche Proteine, die befähigt sind, L-Rhamnose in eine andere Hexose zu konvertieren. Bevorzugt meint L-Rhamnose-Isomerase, solche Proteine, die befähigt sind L-Rhamnose in L-Rhamnulose zu überführen (EC 5.3.1.14). 35 Besonders bevorzugt ist das RhaA-Gen aus Organismen der Enterobacteriaceae Familie, insbesondere *E.coli*. Am meisten bevorzugt meint L-Rhamnose-Isomerase das Protein gemäß SEQ ID NO: 9, sowie homologe Sequenzen aus anderen Organismen, bevorzugt aus anderen prokaryontischen Organismen.

40 Funktionelle Äquivalente zu der L-Rhamnose-Isomerase gemäß SEQ ID NO: 9 umfasst bevorzugt solche Sequenzen die

a) im wesentlichen die gleiche Enzymaktivität wie die L-Rhamnose-Isomerase gemäß SEQ ID NO: 9 aufweisen und

10

- b) die eine Homologie aufweisen von mindestens 50 %, bevorzugt 70 %, vorzugsweise mindestens 80 %, besonders bevorzugt mindestens 90 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 95 %, am meisten bevorzugt 99% zu der Sequenz der L-Rhamnose-Isomerase gemäß SEQ ID NO: 9, wobei sich die Homologie über eine Länge von von mindestens 30 Aminosäuren, bevorzugt mindestens 50 Aminosäuren, besonders bevorzugt von mindestens 100 Aminosäuren, ganz besonders bevorzugt von mindestens 200 Aminosäuren, am meisten bevorzugt über die gesamte Länge des Proteins erstreckt.

Neben der L-Rhamnose-Isomerase können noch weitere Defizienzen in Bezug auf Gene vorliegen, die eine Funktion der L-Rhamnose-Metabolisierung haben. Insbesondere seien hierbei zu nennen Defizienz der Rhamnulose-1-Phosphatase/Kinase (z.B. RhaB; beispielsweise beschrieben durch SEQ ID NO: 11), eine Defizienz der Rhamnulophosphat-Aldolase (z.B. RhaD; beispielsweise beschrieben durch SEQ ID NO: 13) oder eine Defizienz in mindestens einem die Expression vorgenannter Proteine kontrollierenden regulatorischen Element (wie z.B. Promotor, Regulator o.ä.).

Unter Umständen kann es ferner vorteilhaft sein eine Defizienz in einem aktiven Rhamnose-Transportsystem (z.B. RhaT; beispielsweise beschrieben durch SEQ ID NO: 19) zu erzeugen.

"Defizienz" meint in Bezug auf eine L-Rhamnose-Isomerase oder ein anderes Enzym der L-Rhamnose-Aufnahme/Metabolisierung die im wesentlichen vollständige, auf unterschiedliche zellbiologische Mechanismen beruhende Unterbindung oder Blockierung der Expression des entsprechenden Zielgens oder der von ihm abgeleiteten mRNA und/oder des dadurch kodierten Proteinproduktes oder die Veränderung der Proteinsequenz des Genproduktes in einer Weise, das dessen Funktion und/oder Aktivität im wesentlichen unterbunden oder so geändert ist, dass L-Rhamnose im wesentlichen nicht mehr umgesetzt werden kann.

Eine Unterbindung oder Blockierung im Sinne der Erfindung umfasst insbesondere die mengenmässige Verringerung einer vom Zielgen exprimierten mRNA und/oder des dadurch kodierten Proteinproduktes bis hin zu einem im wesentlichen vollständigen Fehlen derselben. Dabei wird die Expression einer bestimmten mRNA und/oder des dadurch kodierten Proteinproduktes in einer Zelle oder einem Organismus im Vergleich zu der selben Zelle oder Organismus, die dem Verfahren nicht unterworfen wurden, bevorzugt um mehr als 50 %, besonders bevorzugt um mehr als 80%; ganz besonders bevorzugt um mehr als 90 %, am meisten bevorzugt mehr als 95 % vermindert.

11

Ganz besonders bevorzugt meint Verminderung die vollständige Inaktivierung eines endogenen Gens ("knockout"-Mutation).

Eine Unterbindung oder Blockierung kann auf unterschiedlichen Mechanismen beruhen. Bevorzugt beruht die Unterbindung oder Blockierung auf einer Mutation in dem entsprechenden Zielgen, wobei die Mutation in einer Substitution, Deletion und/oder Addition eines oder mehrerer Nukleotide bestehen kann. Besonders bevorzugt ist eine Unterbindung oder Blockierung mittels Transposon unterstützter Mutagenese oder mittels gezieltem Knock-out.

Die Verminderung kann durch den Fachmann geläufigen Verfahren ermittelt werden. So kann die Verminderung der Proteinmenge beispielsweise durch immunologischen Nachweis des Proteins bestimmt werden. Weiterhin können biochemische Techniken wie Northern-Hybridisierung, "nuclease protection assay", Reverse Transkription (quantitative RT-PCR), ELISA ("enzyme linked immunosorbent assay"), Western-Blotting, Radioimmunoassay (RIA) oder andere Immunoassays sowie "fluorescence activated cell analysis" (FACS) eingesetzt werden. Je nach Art des verminderten Proteinproduktes kann auch dessen Aktivität oder der Einfluss auf den Phänotyp des Organismus oder der Zelle ermittelt werden.

"Proteinmenge" meinte die Menge eines bestimmten Polypeptides in einem Organismus, einem Gewebe, einer Zelle oder einem Zellkompartiment.

"Verminderung" der Proteinmenge meint die Verminderung der Menge eines bestimmten Polypeptides in einem Organismus, einem Gewebe, einer Zelle oder einem Zellkompartiment im Vergleich zu dem Wildtyp derselben Gattung und Art auf den dieses Verfahren nicht angewendet wurde, unter ansonst gleichen Rahmenbedingungen (wie beispielsweise Kulturbedingungen, Alter, Nährstoffzufuhr etc.). Die Verminderung beträgt dabei mindestens 50 %, bevorzugt mindestens 70%, besonders bevorzugt mindestens 90 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 95%, am meisten bevorzugt mindestens 99 %. Verfahren zur Bestimmung der Proteinmenge sind dem Fachmann bekannt. Beispielhaft seien zu nennen: Das Mikro-Biuret Verfahren (Goa J (1953) Scand J Clin Lab Invest 5:218-222), die Folin-Ciocalteu-Methode (Lowry OH et al. (1951) J Biol Chem 193:265-275) oder die Messung der Adsorption von CBB G-250 (Bradford MM (1976) Analyt Biochem 72:248-254).

12

Die Verminderung der L-Rhamnose-Isomerase Aktivität kann insbesondere mittels enzymatischer Testsysteme bestimmt werden. Entsprechende Testsysteme sind dem Fachmann bekannt (Bhuiyan SH et al. (1997) J Ferment Bioeng 84(4):319-323).

5

"In prokaryontischen Wirtszellen episomal replizierbares DNA-Konstrukt" meint all solche DNA-Konstrukte, welche unterschieden sind von der chromosomalen DNA der besagten Wirtszelle und parallel zu dieser in der besagten Wirtszelle existieren und befähigt sind in besagter Wirtszelle unter Verwendung zelleigener oder anderer (beispielsweise über das DNA-Konstrukt selber kodierter) Replikationsmechanismen zu replizieren. Das DNA-Konstrukt kann eine einzel- oder doppelsträngige DNA-Struktur darstellen. Bevorzugt hat das DNA-Konstrukt zumindest zeitweise (d.h. zu einem Zeitpunkt seines Replikationszyklus) eine doppelsträngige DNA-Struktur.

Bevorzugt liegen die besagten episomal replizierbaren DNA-Konstrukte in einer Kopienzahl von mindestens 1, bevorzugt mindestens 5, besonders bevorzugt mindestens 10 in einer Wirtszelle vor.

"Selektion prokaryontischer Wirtszellen, welche besagtes DNA-Konstrukt in episomaler Form enthalten" meint die Auswahl von Wirtzellen, die besagtes DNA-Konstrukt in episomaler Form enthalten. Die Auswahl kann beispielsweise unter Verwendung eines der unten beschriebenen Selektionsmarker realisiert werden. Bevorzugt insertiert das DNA-Konstrukt nicht in die chromosomalne DNA der Wirtszelle. Dies kann beispielsweise dadurch verhindert werden, dass das DNA-Konstrukt keine Sequenzen aufweist, die über einen längeren Bereich identisch zu chromosomalnen Sequenzen der Wirtszelle sind.

35
40

Bevorzugt haben besagte episomal replizierbaren DNA-Konstrukte eine Größe/Länge von maximal 100.000 Basen bzw. Basenpaaren, besonders bevorzugt maximal 50.000 Basen bzw. Basenpaaren, ganz besonders bevorzugt 10.000 Basen bzw. Basenpaaren (die Angabe Basen bzw. basenpaaren richtet sich danach, ob das DNA-Konstrukt eine einzel- oder doppelsträngige DNA-Struktur darstellt).

Bevorzugt handelt es sich bei dem DNA-Konstrukt um einen Vektor. Vektoren können beispielhaft Plasmide, Cosmide, Phagen, Viren, Retroviren oder auch Agrobakterien sein. Bevorzugt ist der Vektor eine zirkuläres Plasmid, das die zu exprimierende Nukleinsäuresequenz in rekombinanter Form umfasst und zu autonomer Replikation in der prokaryotischen Wirtszelle befähigt ist. Vektor kann im Rahmen dieser Erfindung auch als rekombinanter Vektor oder rekombinante Form des Vektors verstanden werden.

13

binanter Expressionsvektor bezeichnet werden. Verschiedene Sequenzen, die die Replikation von DNA in Prokaryonten erlauben sind dem Fachmann bekannt. Beispielhaft seien genannt ORI (origin of DNA replication), der pBR322 ori oder der P15A ori (Sambrook et al.: Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

Entsprechend geeignete Replikationsursprünge, die eine geringe Kopienzahl gewährleisten ("Low-Copy") können aus BAC (Bacterial artificial chromosomes), F-Plasmiden, Cosmiden wie z.B. pWE15 isoliert werden. Entsprechend geeignete Replikationsursprünge, die eine mittlere Kopienzahl gewährleisten ("Medium-Copy") können z.B. aus pBR322 (Lin-Chao S, Bremer H, Mol Gen Genet 1986 203(1): 143-149) und Derivate wie der pJOE-Serie, pKK223-3, pQE30, pQE40 oder Plasmiden mit einem R1 Ursprung wie pRSF1010 und Derivate wie z.B. pML122, p15A, pSC101 isoliert werden. Entsprechend geeignete Replikationsursprünge, die eine hohe Kopienzahl gewährleisten ("High-Copy") können z.B. aus Phagemiden wie pBluescript II SK/KS+/-, pGEM etc. isoliert werden. Die jeweils in einer Zelle vorliegende Kopienzahl wird zum Teil durch den sogenannten Replikationsursprung (auch Replikon genannt) bestimmt. Plasmide der pBR322 Serien enthalten den ColE1 Replikationsursprung aus pMB1. Dieser ist relativ streng kontrolliert und resultiert in einer Kopienzahl von ca. 25 pro Zelle. Plasmide der pUC umfassen eine mutierte ColE1 Version und können in 200 bis 700 Plasmidkopien pro Zelle vorliegen. Einige Plasmide umfassen den p15a Replikationsursprung, der in einer geringen Kopienzahl resultiert.

30 Als Vektoren seien beispielhaft zu nennen:

- a) in E.coli sind bevorzugt pQE70, pQE60 und pQE-9 (QIAGEN, Inc.); pBluescript Vektoren, Phagescript Vektoren, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A (Stratagene Cloning Systems, Inc.);
35 ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia Biotech, Inc.); pLG338, pACYC184, pBR322, pUC18, pUC19, pKC30, pRep4, pHs1, pHs2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III¹¹³-B1, λgt11 oder pBdCI,
- 40 b) in Streptomyces sind bevorzugt pIJ101, pIJ364, pIJ702 oder pIJ361,
- c) in Bacillus sind bevorzugt pUB110, pC194 oder pBD214,
- 45 d) in Corynebacterium pSA77 oder pAJ667,

14

oder Derivate der vorstehend genannten Plasmide. Die genannten Plasmide stellen eine kleine Auswahl der möglichen Plasmide dar. Weitere Plasmide sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus dem Buch Cloning Vektors (Eds. Pouwels P. H. 5 et al. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018) entnommen werden.

"Transformation" oder "transformiert" meint die Einführung genetischen Materials wie beispielsweise eines Vektors (z.B. ein 10 Plasmid) in eine prokaryotische Wirtzelle. Dazu stehen dem Fachmann verschiedene weiter unten im Detail beschriebene Verfahren zu Verfügung. Eine prokaryotische Wirtzelle, in die besagtes genetisches Material eingeführt wurde, als auch die aus dieser Zelle resultierenden "Nachkommen" und Kolonien, die besagtes 15 genetisches Material umfassen, werden als "Transformanten" bezeichnet.

"Transduktion" oder "transduziert" meint die Einführung genetischen Materials in eine prokaryotische Wirtzelle ausgehend von 20 dem genetischen Material eines Bakteriophagen. Eine prokaryotische Wirtzelle, in die besagtes genetisches Material eingeführt wurde, als auch die aus dieser Zelle resultierenden "Nachkommen" und Kolonien, die besagtes genetisches Material umfassen, werden 25 als "Transduktanten" bezeichnet.

25 "Rekombinantes Protein" meint jedes Proteinprodukt, dass ausgehend von der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz unter funktioneller Kontrolle des L-Rhamnose-induzierbaren Promoters exprimiert werden kann und schließt Peptide, Polypeptide, Proteine, Oligoproteine und/oder Fusionsproteine ein. Bevorzugt meint 30 "rekombinantes Protein" ein Protein mikrobiellen, bakteriellen, tierischen oder pflanzlichen Ursprungs.

"Fusionsproteine" meint eine Fusion aus dem gewünschten Protein 35 und Leitsequenzen die eine Expression in bestimmten Kompartimenten (z.B. Periplasma oder Cytoplasma) der Wirtzelle oder in das umgebende Medium ermöglichen. Beispielhaft sei die pelB Leitsequenz zu nennen (US 5,576,195; US 5,846,818).

40 "Expressionskassette" meint jeweils die Kombination eines Promotors mit mindestens einer unter dessen Kontrolle transkribierbaren Nukleinsäuresequenz.

"Heterolog" meint in Bezug auf das Verhältnis des L-Rhamnose-induzierbaren Promotors und der unter Kontrolle besagten Promotors zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz, bzw. eine Expressionskassette oder einen Expressionsvektor alle solche durch gen-

15

technische Methoden zustande gekommene Konstruktionen, in denen entweder

- a) mindestens eine der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen,
5 oder
- b) mindestens einer der L-Rhamnose-induzierbaren Promotoren, der die Expression besagter zu exprimierender Nukleinsäuresequenz steuert, oder
10
- c) (a) und (b)

sich nicht in ihrer natürlichen, genetischen Umgebung (beispielsweise an ihrem natürlichen chromosomalen Locus) befinden oder
15 durch gentechnische Methoden modifiziert wurden, wobei die Modifikation beispielhaft Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste umfassen kann.

20 Im erfindungsgemäßen Verfahren werden die erfindungsgemäßen prokaryontischen Wirtszellen in einem Medium, dass das Wachstum dieser Organismen ermöglicht, angezüchtet. Dieses Medium kann ein synthetisches oder ein natürliches Medium sein. Je nach Organismus werden dem Fachmann bekannte Medien verwendet. Für das Wachstum der Mikroorganismen enthalten die verwendeten Medien eine Kohlenstoffquelle, eine Stickstoffquelle, anorganische Salze und gegebenenfalls geringe Mengen an Vitamine und Spurenelementen.
25

Vorteilhafte Kohlenstoffquellen sind beispielsweise Polyole wie
30 Glycerin, Zucker wie Mono-, Di- oder Polysaccharide wie Glucose, Fructose, Mannose, Xylose, Galactose, Ribose, Sorbose, Ribulose, Laktose, Maltose, Saccharose, Raffinose, Stärke oder Cellulose, komplexe Zuckerquellen wie Melasse, Zuckerphosphate wie Fructose-1,6-bisphosphat, Zuckeralkohole wie Mannit, Alkohole wie
35 Methanol oder Ethanol, Carbonsäuren wie Citronensäure, Milchsäure oder Essigsäure, Fette wie Sojaöl oder Rapsöl, Aminosäuren wie ein Aminosäurengemisch beispielsweise sog. Casamino acids (Difco) oder einzelne Aminosäuren wie Glyzin oder Asparaginsäure oder Aminozucker, die letztgenannten können auch gleichzeitig als
40 Stickstoffquelle verwendet werden. Besonders bevorzugt sind Polyole, insbesondere Glycerin.

Bevorzugt sollte das eingesetzte Medium als Basismedium keine L-Rhamnose enthalten, um eine möglichst dichte Regulation der
45 Expression zu gewährleisten. Die L-Rhamnose wird dann im Bedarfsfall, zum gewünschten Zeitpunkt oder Zelldichte in der jeweils

gewünschten Konzentration zugefügt.

Vorteilhafte Stickstoffquellen sind organische oder anorganische Stickstoffverbindungen oder Materialien, die diese Verbindungen enthalten. Beispiele sind Ammoniumsalze wie NH_4Cl oder $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Nitrate, Harnstoff, oder komplexe Stickstoffquellen wie Maisquellwasser, Bierhefeautolysat, Sojabohnenmehl, Weizengluten, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Caseinhydrolysat, Hefe oder Kartoffelprotein, die häufig auch gleichzeitig als Stickstoffquelle dienen können.

Beispiele für anorganische Salze sind die Salze von Calcium, Magnesium, Natrium, Kobalt, Molybdän, Mangan, Kalium, Zink, Kupfer und Eisen. Als Anion dieser Salze sind besonders das Chlor-, Sulfat- und Phosphation zu nennen. Ein wichtiger Faktor zur Steigerung der Produktivität im erfundungsgemässen Verfahren ist die Kontrolle der Fe^{2+} - oder Fe^{3+} -Ionenkonzentration im Produktionsmedium.

Gegebenenfalls werden dem Nährmedium weitere Wachstumsfaktoren zugesetzt, wie beispielsweise Vitamine oder Wachstumsförderer wie Biotin, 2-KLG, Thiamin, Folsäure, Nicotinsäure, Pantothenat oder Pyridoxin, Aminosäuren wie Alanin, Cystein, Prolin, Asparaginsäure, Glutamin, Serin, Phenylalanin, Ornithin oder Valin, Carbonsäuren wie Citronensäure, Ameisensäure, Pimelinsäure oder Milchsäure, oder Substanzen wie Dithiothreitol.

Das Mischungsverhältnis der genannten Nährstoffe hängt von der Art der Fermentation ab und wird im Einzelfall festgelegt. Die Mediumkomponenten können alle zu Beginn der Fermentation vorgelegt werden; nachdem sie falls erforderlich getrennt sterilisiert oder gemeinsam sterilisiert wurden, oder aber je nach Bedarf während der Fermentation kontinuierlich oder diskontinuierlich nachgegeben werden.

Die Züchtungsbedingungen werden so festgelegt, dass die Organismen so wachsen, dass die bestmöglichen Ausbeuten (zu ermitteln beispielsweise durch die Aktivitätsmenge des exprimierten rekombinaten Proteins) erreicht werden. Bevorzugte Züchtungstemperaturen liegen bei 15 °C bis 40 °C. Besonders vorteilhaft sind Temperaturen zwischen 25 °C und 37 °C. Vorzugsweise wird der pH-Wert in einem Bereich von 3 bis 9 festgehalten. Besonders vorteilhaft sind pH-Werte zwischen 5 und 8. Im allgemeinen ist eine Inkubationsdauer von wenigen Stunden bis zu einigen Tagen bevorzugt von 8 Stunden bis zu 21 Tagen, besonders bevorzugt von 4 Stunden bis

17

14 Tagen ausreichend. Innerhalb dieser Zeit reichert sich die maximale Menge an Produkt im Medium an.

Wie Medien vorteilhaft optimiert werden können, kann der Fachmann 5 beispielsweise dem Lehrbuch Applied Microbiol Physiology, "A Practical Approach (Eds. PM Rhodes, PF Stanbury, IRL-Press, 1997, Seiten 53 - 73, ISBN 0 19 963577 3) entnehmen.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann kontinuierlich oder diskontinuierlich in batch- oder fed-batch-weise durchgeführt werden.

"Mutation" oder "Mutationen" meint die Substitution, Addition, Deletion, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer Aminosäurerreste bzw. Basen/Basenpaare.

15 "Homologie" zwischen zwei Nukleinsäuresequenzen meint die Identität der Nukleinsäuresequenz über die jeweils angegebene Sequenzlänge, die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA; Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389ff) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

Gap Weight: 50

Length Weight: 3

25

Average Match: 10

Average Mismatch: 0

Beispielhaft wird unter einer Sequenz, die eine Homologie von mindestens 50 % auf Nukleinsäurebasis mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 aufweist, eine Sequenz verstanden, die bei einem Vergleich mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 nach obigem Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Homologie von mindestens 50 % aufweist.

30 "Homologie" zwischen zwei Polypeptiden meint die Identität der Aminosäuresequenz über die jeweils angegebene Sequenzlänge, die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

40

Gap Weight: 8

Length Weight: 2

Average Match: 2,912

Average Mismatch:-2,003

45 Beispielhaft wird unter einer Sequenz, die eine Homologie von mindestens 50 % auf Proteinbasis mit der Sequenz SEQ ID NO: 9 aufweist, eine Sequenz verstanden, die bei einem Vergleich mit

der Sequenz SEQ ID NO: 9 nach obigem Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Homologie von mindestens 50 % aufweist.

Für eine optimale Expression heterologer Gene in Organismen kann es vorteilhaft sein, die Nukleinsäuresequenzen entsprechend der im Organismus verwendeten spezifischen "codon usage" zu verändern. Die "codon usage" lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene des betreffenden Organismus leicht ermitteln.

10 Das DNA-Konstrukt, welches den L-Rhamnose-induzierbaren Promotor und die unter dessen Kontrolle zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz umfasst, gewährleistet aufgrund einer funktionellen Verknüpfung von besagtem Promotor und besagter Nukleinsäuresequenz 15 die Transkription und/oder Translation besagter Nukleinsäuresequenz.

Unter einer funktionellen Verknüpfung versteht man allgemein eine Anordnung in der eine genetische Kontrollsequenz ihre Funktion in Bezug auf die zu exprimierende Nukleinsäuresequenz ausüben kann. 20 Bezug auf die zu exprimierende Nukleinsäuresequenz ausüben kann. Funktion kann dabei beispielsweise die Kontrolle der Expression d.h. Transkription und/oder Translation der Nukleinsäuresequenz bedeuten. Kontrolle umfasst dabei beispielsweise die Initiierung, Steigerung, Steuerung oder Suppression der Expression d.h. Transkription und ggf. Translation. Unter einer funktionellen Verknüpfung versteht man zum Beispiel die sequentielle Anordnung eines Promoter, der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz und ggf. weiterer regulativer Elemente wie zum Beispiel einem Terminator derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion 25 bei der Expression der Nukleinsäuresequenz erfüllen kann. Dem Fachmann sind verschiedene Wege bekannt, um zu einem der erfundungsgemässen DNA-Konstrukte zu gelangen. Die Herstellung kann mittels gängiger Rekombinations- und Klonierungstechniken realisiert werden, wie sie beispielsweise in T Maniatis, EF Fritsch 30 und J Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in TJ Silhavy, ML Berman und LW Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, FM et al., Current Protocols in Molecular 35 Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987) beschrieben sind.

Besagtes DNA-Konstrukt kann weitere Funktionselemente enthalten. Der Begriff der Funktionselemente ist breit zu verstehen und 45 meint all solche Sequenzen, die einen Einfluss auf das Zustandekommen, die Vermehrung oder Funktion der erfundungsgemässen DNA-Konstrukte oder Organismen haben. Funktionselemente gewährle-

19

sten, verstärken, regulieren oder modifizieren zum Beispiel die Transkription und gegebenenfalls Translation in entsprechenden Wirtsorganismen.

5 Funktionselemente sind beispielsweise beschrieben bei "Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)" oder "Gruber and Crosby, in: Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, CRC Press, Boca Raton, Florida, eds.: Glick and Thompson, Chapter 7, 89-108" sowie

10 den dort aufgewiesenen Zitaten. Je nach nachstehend näher beschriebenen Wirtsorganismus oder Ausgangsorganismus, der durch Einbringen der Expressionskassetten oder Vektoren in einen genetisch veränderten oder transgenen Organismus überführt wird, eignen sich verschiedene Kontrollsequenzen.

15 "Genetische Kontrollsequenzen" umfassen beispielsweise die 5'-untranslatierte Region oder die nichtkodierende 3'-Region von Genen. "Genetische Kontrollsequenzen" meint ferner Sequenzen, die für Fusionsproteine bestehend aus einer Signalpeptidsequenz

20 kodieren. Beispielhaft aber nicht einschränkend seien zu nennen:

a) Selektionsmarker

Selektionsmarker sind in der Regel erforderlich, um erfolgreich transformierte Zellen zu selektionieren und den Verlust des DNA-Kontraktes aus der Wirtszelle im Laufe der Zeit und der Zellteilungen zu verhindern. Ein solcher Verlust kann insbesondere dann auftreten, wenn das durch die zu exprimierende Nukleinsäuresequenz kodierte rekombinante Protein einen toxischen Effekt auf den prokaryontischen Organismus hat. Der mit dem Expressionskonstrukt eingebrachte selektionierbare Marker verleiht den erfolgreich transformierten Zellen eine Resistenz gegen ein Biozid (zum Beispiel ein Antibiotikum wie zum Beispiel Ampicillin, Kanamycin oder Hygromycin) verleiht. Beispielhaft als Selektionsmarker seien genannt:

35

- Amp (Ampicillin-Resistenz; β -Lactamase)
- Cab (Carbenicillin-Resistenz)
- Cam (Chloramphenicol-Resistenz)
- Kan (Kanamycin-Resistenz)
- Rif (Rifampicin-Resistenz)
- Tet (Tetracyclin-Resistenz)
- Zeo (Zeocin-Resistenz)
- Spec (Spectinomycin)

40 45 Der Selektionsdruck wird durch entsprechende Mengen des Antibiotikums aufrechterhalten. Beispielhaft seien zu nennen: Ampicillin 100 mg/l, Carbenicillin 100 mg/l, Chloramphenicol.

20

35 mg/l, Kanamycin 30 mg/l, Rifampicin 200 mg/l, Tetracyclin
12,5 mg/l, Spectinomycin 50 mg/l.

Selektionsmarker umfassen ferner solche Gene und Genprodukte,
5 die beispielsweise durch Komplementation einer genetischen
Defizienz in der Aminosäure- oder Nukleotidsynthese, eine
Selektion einer entsprechend transformierten Wirtszelle er-
möglichen. Dazu werden i.a. Medien eingesetzt, die besagte
10 Aminosäure oder den besagten Nukleotidbaustein nicht enthal-
ten. Verschiedene derartige Systeme sind dem Fachmann be-
kannt. Beispielhaft seien die Defizienzen in der Tryptophan
(z.B. trpC), Leucin (z.B. leuB), Histidin (z.B. hisB) Bio-
synthese zu nennen, wie sie z.B. im E.coli Stamm KC8 (Clon-
tech) vorliegen. Diese Defizienzen können u.a. durch die se-
15 lektionierbaren Marker TRP1, Leu2 und HIS3 komplementiert
werden.

b) Transkriptionsterminatoren

Der Transkriptionsterminator verhindert eine ungewollte Tran-
20 skription und erhöht die Plasmid- und mRNA Stabilität.

c) Shine-Dalgarno Sequenzen

Eine Shine-Dalgarno (SD) Sequenz ist erforderlich für die In-
itiation der Translation und ist komplementär zum 3'-Ende der
25 16S ribosomalen RNA. Die Effizienz der Initiation der Trans-
lation am Start-Kodon hängt von der tatsächlichen Sequenz
ab. Eine geeignete Konsensussequenz für E.coli ist beispiel-
haft: 5'-TAAGGAGG-3'. Sie ist ca. 4 bis 14 Nukleotide stro-
maufwärts des Startkodon lokalisiert, wobei das Optimum bei 8
30 Nukleotiden liegt. Um die Ausbildung von Sekundärstrukturen
zu vermeiden (welche die Expression reduzieren können),
sollte diese Region bevorzugt reich an A/T-Nukleotiden sein.

d) Startkodon

Das Startkodon ist der Initiationpunkt der Translation. In
E. coli ist ATG das meist genutzte Startkodon; GTG kann al-
ternativ auch genutzt werden.

e) "Tags" und Fusionsproteins

40 N- or C-terminale Fusionen der zu exprimierenden rekombinan-
ten Proteine mit kürzeren Peptiden ("Tags") oder anderen Pro-
teinen (Fusionpartnern) können vorteilhaft sein. Sie können
beispielsweise eine verbesserte Expression, Löslichkeit, De-
tektierbarkeit und Aufreinigung ermöglichen. Bevorzugt werden
45 derartige Fusionen mit Protease-Spaltsequenzen (z.B. für
Thrombin oder Faktor X) kombiniert, die eine Entfernung des

21

"Tags" bzw. "des Fusionspartners nach der Expression und Aufreinigung ermöglichen.

- f) Multiple Klonierungsregionen (Multiple cloning site; MCS). erlauben und erleichtern die Insertion einer oder mehrerer Nukleinsäuresequenzen.
- g) Stop-Kodon / Translationsterminatoren
Von den drei möglichen Stopp-Kodons ist TAA bevorzugt, da es bei TAG und TGA unter Umständen zu einem "Durchlesen" ("Read-Through") ohne Abbruch der Translation kommen kann. Es können auch mehrere Stopp-Kodons infolge eingesetzt werden um eine verlässliche Termination zu gewährleisten.
- 15 h) Reportergene
Reportergene kodieren für leicht quantifizierbare Proteine, die über Eigenfarbe oder Enzymaktivität eine Bewertung der Transformationseffizienz, der Expressionshöhe, des Expressortes oder -zeitpunktes gewährleisten. Reportergene können z.B. für nachfolgende Proteine kodieren: Hydrolasen, Fluoreszenzproteine, Biolumineszproteine, Glucosidasen oder Peroxidasen. Bevorzugt sind Luciferasen, β -Galactosidasen, β -Glucuronidase, "Green Fluorescence Protein", Acetyl-, Phospho- oder Adenyltransferasen (siehe auch Schenborn E, Groskreutz D (1999) Mol Biotechnol 13(1):29-44).

Im Falle von Selektionsmarkern oder Reporterproteinen ist die für besagte Proteine kodierende Nukleinsäuresequenz bevorzugt mit einem in dem entsprechenden prokaryontischen Wirtorganismus funktionellen Promotor und ggf. weiteren Kontrollsequenzen funktional zu einer Expressionskassette verknüpft. Vorteilhafte Promotoren und Kontrollsequenzen sind dem Fachmann allgemein bekannt. Beispielhaft seien Promotoren wie cos-, tac-, trp-, tet-, lpp-, lac-, lacIq-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-, λ -PR- oder 35 λ -PL-Promotor zu nennen.

Die Herstellung einer transformierten Wirtzelle oder eines transformierten Wirtsorganismus erfordert, dass die entsprechende DNA (beispielsweise eine der erfindungsgemäßen Expressionskassetten oder Vektoren) in die entsprechende Wirtszelle eingebracht wird. Für diesen Vorgang, der als Transformation bezeichnet wird, steht eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung (siehe auch Keown et al. (1990) Methods in Enzymology 185:527-537). So kann die DNA beispielhaft direkt durch Mikroinjektion, Elektroporation oder durch 45 Bombardierung mit DNA-beschichteten Mikropartikeln (biolistische Verfahren mit der Genkanone "particle bombardment") eingeführt werden. Auch kann die Zelle chemisch, zum Beispiel mit Polyethy-

22

1 lenglycol, permeabilisiert werden, so dass die DNA durch Diffusion in die Zelle gelangen kann. Die DNA kann auch durch Fusion mit anderen DNA-enthaltenden Einheiten wie Minicells, Zellen, Lysosomen oder Liposomen erfolgen. Elektroporation ist eine weitere geeignete Methode zur Einführung von DNA, bei der die Zellen reversibel durch einen elektrischen Impuls permeabilisiert werden. Als bevorzugte allgemeine Methoden seien zu nennen Calcium-phosphat vermittelte Transformation, DEAE-Dextran vermittelte Transformation, kationische Lipid-vermittelte Transformation,

5 10 Elektroporation, Transduktion, Infektion. Derartige Verfahren sind dem Fachmann geläufig und beispielsweise beschrieben (Davis et al. (1986) Basic Methods In Molecular Biology; Sambrook J et al. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel FM et al. (1994) Current protocols in molecular biology, John Wiley and Sons; Glover DM et al.

15 20 (1995) DNA Cloning Vol.1, IRL Press ISBN 019-963476-9).

Transformierte Zellen d.h. solche, die die eingeführte DNA enthalten, können von untransformierten selektiert werden, wenn ein selektionierbarer Marker Bestandteil der eingeführten DNA ist. Verschiedene Selektionsmarker sind oben beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist hinsichtlich der Art und Sequenz der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz bzw. des davon ausgehend exprimierten rekombinanten Proteins nicht eingeschränkt. Die unter Kontrolle der L-Rhamnose-induzierbaren Promotors zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können vielfältiger Art sein. Expression meint in diesem Zusammenhang Transkription und gegebenenfalls Translation. Neben der Expression von Nukleinsäuresequenzen, welche für rekombinante Proteine kodieren, können auch Nukleinsäuresequenzen exprimiert werden, die beispielsweise die Transkription einer antisense-RNA bedingen und so die Expression eines endogenen Gens der prokaryontischen Wirtszelle vermindern. Sowohl Sequenzen prokaryontischen als auch eukaryontischen Ursprungs können exprimiert werden. Bevorzugt werden Sequenzen exprimiert die für rekombinante Proteine kodieren, die in einem größeren Umfang herzustellen sind. Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien zu nennen:

40 a) Enzyme, wie z.B. Chymosin, Proteasen, Polymerasen, Saccharidasen, Dehydrogenasen, Nukleasen, Glucanasen, Glucoseoxidase, α -Amylase, Oxidoreduktases (wie Peroxidasen oder Laccasen), Xylanasen, Phytasen, Cellulasen, Collagenasen, Hemicellulasen und Lipasen. Insbesondere bevorzugt sind

23

- Enzyme wie sie in Waschmitteln oder anderen Detergentien genutzt werden wie beispielsweise Meerrettichperoxidase, Proteasen, Amylasen, Lipasen, Esterasen oder Cellulasen
 - Enzyme wie sie in der Lebensmittelindustrie genutzt werden wie Proteasen, Lipasen, Lactasen, β -Glucanase, Cellulasen oder Pectinasen
 - Enzyme wie sie in industriellen Verfahren eingesetzt werden wie Lipasen, α -Amylasen, Amiloglucosidasen, Glucomylasen, Pullulanasen, Glucoseisomerasen,
 - 10 - Enzyme wie sie in industriellen Verfahren zur Herstellung von Chemikalien und Feinchemikalien eingesetzt werden wie Lipasen, Amidasen, Nitrilhydratasen, Esterasen oder Nitrilasen
 - Enzyme wie sie in der Tierernährung eingesetzt werden wie β -Glucanasen
 - 15 - Enzyme wie sie in der Papier- oder Lederindustrie eingesetzt werden wie Amylasen, Collagenasen, Cellulasen oder Xylanasen.
- 20 b) Säugerproteine wie beispielsweise Blutproteins (z.B. Serumalbumin, Faktor VII, Faktor VIII, Faktor IX, Faktor X, Gewebeplasminogenfaktor, Protein C, von Willebrand-Faktor, anti-Thrombin III oder Erythropoietin), "Colony Stimulating Factors" (CFS) (z.B. "Granulocyte colony-stimulating factor" (G-CSF), "Macrophage colony-stimulating factor" (M-CSF) oder "Granulocyte macrophage colony-stimulating factor" (GM-CSF)), Cytokine (z.B. Interleukine), Integrine, Addressine, Selectine, Antikörper oder Antikörperfragmente, Strukturproteine (z.B. Collagen, Fibroin, Elastin, Tubulin, Actin oder Myosin), Wachstumsfaktoren, Zellzyklusproteine, Impfstoffe, Fibrinogen, Thrombin, Insulinen.

In einer bevorzugten Ausführungform ist das rekombinante Protein eine Nitrilase, bevorzugt eine Nitrilase beschrieben durch eine 35 Aminosäuresequenz, die kodiert wird durch eine Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 6 dargestellten Sequenz,
- 40 b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 6 dargestellten Nukleinsäuresequenz ableiten,
- 45 c) Derivate der in SEQ ID NO: 6 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 7 dargestellten Aminosäuresequenzen kodieren und mindestens 35 %

Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne dass die enzymatische Wirkung der Polypeptide wesentlich reduziert ist.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung der oben beschriebenen erfindungsgemäßen Wirtszellen oder -organismen zur Herstellung von Nahrungs- oder Futtermitteln, Pharmazeutika oder Feinchemikalien. Feinchemikalien meint bevorzugt Proteine, Enzyme, Vitamine, Aminosäuren, Zucker, Fettsäuren, natürliche und synthetische Geschmacks-, Aroma- und Farbstoffe.

10 Ferner betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung von rekombinanten Proteinen, Enzymen und anderen Feinchemikalien wie beispielsweise Aldehyden, Ketonen oder Carbonsäuren (bevorzugt chiraler Carbonsäuren) unter Einsatz einer der erfindungsgemäßen 15 prokaryontischen Wirtszellen oder einer Präparationen derselben. Die bevorzugten Proteine und Enzyme sind oben aufgeführt.

Dabei kann die prokaryontische Wirtzelle in einem wachsenden, ruhenden, immobilisierten oder aufgeschlossenen Zustand vorliegen. Unter aufgeschlossenen Zellen sind beispielsweise Zellen zu verstehen, die über eine Behandlung mit beispielsweise Lösungsmitteln durchlässig gemacht worden sind, oder Zellen die über eine Enzymbehandlung, über eine mechanische Behandlung (z.B. French Press oder Ultraschall) oder über eine sonstige Methode 25 aufgebrochen wurden. Die so erhaltenen Rohextrakte sind für das erfindungsgemäße Verfahren vorteilhaft geeignet. Auch partiell gereinigte Enzympräparationen können für das Verfahren verwendet werden. Ebenfalls geeignet sind immobilisierte Mikroorganismen oder Enzyme, die vorteilhaft in der Reaktion Anwendung finden 30 können.

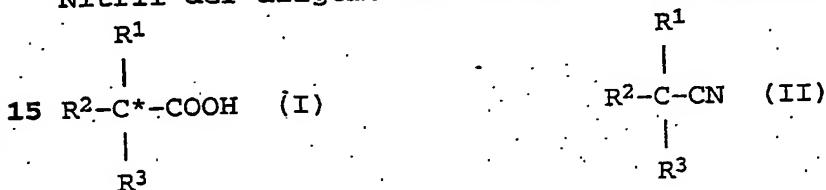
Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft Verfahren zur Herstellung chiraler Carbonsäuren, wobei ein racemisches Nitril (oder alternativ dessen Vorstufen Aldehyd und Blausäure/Cyanid-salz) zu besagter chiraler Carbonsäure umgesetzt wird durch Behandlung mit einer prokaryontischen Wirtszelle, die zumindest definiert ist in Bezug auf eine L-Rhamnose-Isomerase und mindestens ein in besagter Wirtzelle replizierbares DNA-Konstrukt enthält, welches eine für eine Nitrilase kodierende Nukleinsäuresequenz 40 unter transkriptioneller Kontrolle eines durch L-Rhamnose-induzierbaren Promotors umfasst, wobei besagter Promotor in Bezug auf besagte Nukleinsäuresequenz heterolog ist.

Die für die Nitrilase kodierende Nukleinsäuresequenz ist bevorzugt aus der Gruppe der oben angegebenen für Nitrilasen kodierenden Sequenzen ausgewählt.

25

Chirale Carbonsäuren sind gesuchte Verbindungen für die organische Synthesechemie. Sie sind Ausgangsprodukte für eine Vielzahl von pharmazeutischen Wirkstoffen oder Wirkstoffen für den Pflanzenschutz. Chirale Carbonsäuren können zur klassischen Racematspaltung über Diastereomeresalze verwendet werden. So wird R-(-)- oder S-(-)-Mandelsäure beispielsweise zur Racematspaltung racemischer Amine eingesetzt. R-(-)-Mandelsäure wird ausserdem als Zwischenprodukt bei der Synthese genutzt.

- 10 In einer bevorzugten Ausführungsform werden die chiralen Carbonsäuren der allgemeinen Formel I ausgehend von einem racemischen Nitrit der allgemeinen Formel II hergestellt.



* ein optisch aktives Zentrum

- 20 R^1 , R^2 , R^3 unabhängig voneinander Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes, verzweigtes oder unverzweigtes C1-C10-Alkyl-, C2-C10-Alkenyl-, substituiertes oder unsubstituiertes Aryl-, Hetaryl-, OR⁴ oder NR⁴R⁵ und wobei die Reste 25 R^1 , R^2 und R^3 immer unterschiedlich sind,
- 30 R^4 Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes, verzweigtes oder unverzweigtes C1-C10-Alkyl-, C2-C10-Alkenyl-, C1-C10-Alkylcarbonyl-, C2-C10-Alkenylcarbonyl-, Aryl-, Arylcarbonyl-, Hetaryl- oder Hetarylcarbonyl-,
- R^5 Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes, verzweigtes oder unverzweigtes C1-C10-Alkyl-, C2-C10-Alkenyl-, Aryl- oder Hetaryl-.

- 35 Als Nitrit am meisten bevorzugt sind Mandelonitril, o-Chlormandelonitril, p-Chlormandelonitril oder m-Chlormandelonitril. Als chirale Carbonsäure sind am meisten bevorzugt R-Mandelsäure, S-Mandelsäure, R-p-Chlormandelsäure, S-p-Chlormandelsäure, 40 R-m-Chlormandelsäure, S-m-Chlormandelsäure, R-o-Chlormandelsäure oder S-o-Chlormandelsäure.

Einzelheiten zu der Durchführung dieser Umsetzungen bzw. zur Aufreinigung der Produkte etc. sind beispielsweise in WO 00/23577 im Detail beschrieben. Auf die dort als beschriebenen Edukte, Produkte und Verfahrensparameter wird ausdrücklich Bezug genommen.

Beispiele

Allgemeine Nukleinsäureverfahren wie z.B. Klonierung, Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelelektrophorese, Verknüpfen von DNA-
 5 Fragmenten, Transformation von Mikroorganismen, Anzucht von Bakterien und Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wenn nichts anderes beschrieben wurde wie bei Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) beschrieben durchgeführt. Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle er-
 10 folgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma ABI nach der Methode von Sanger (Sanger et al. (1977) Proc Natl Acad Sci USA 74:5463-5467). Fragmente resultierend aus einer Polymerase Kettenreaktion wurden zur Vermeidung von Polymerasefehlern in zu exprimierenden Konstrukten sequenziert und überprüft.

15

Beispiel 1: Charakterisierung des E.coli-Stammes JB1204

Escherichia coli JB1204 (CGSC6999, Bulawa CE & Raetz CRH (1984) J Biol Chem 259:11257-11264) besitzt laut Literatur eine Transpo-
 20 soninsertion "rha-14::Tn10", wobei zur Sequenz oder Funktion von "rha-14" keine genaueren Angaben gemacht wurden. JB1204 (ein K12-Derivat) ist aufgrund zahlreicher anderer Mutationen im Wachstum Stämmen wie TG1 und W3110 unterlegen, weshalb er selbst nicht zur technischen Proteinerstellung herangezogen wird.

25

Um zu testen, ob der Stamm E.coli JB1204 noch Rhamnose verstoffwechselt und ob die Induktion eines Rhamnose-abhängigen Expressionssystems in E. coli JB1204 beeinträchtigt ist, wurden kompetente JB1204-Zellen hergestellt und mit dem Plasmid pDHE1650
 30 transformiert, das ein pJOE-Derivat ist und unter Kontrolle des Rhamnose-Promotors das Gen für eine Nitrilase trägt (Plasmid entspricht pDHE19.2 in DE 19848129). Nach 15 h Kultivierung bei 37 °C in LB-Ampicillin-Tetracyclin mit bzw. ohne Rhamnose wurde die optische Dichte der Kulturen gemessen und die Nitrilase-Aktivität
 35 nach Waschen der Zellen im "Resting-Cell"-Assay überprüft (siehe Tabelle 1). Bei Anzucht im Gegenwart von L-Rhamnose findet bei JB1204 wie auch beim Vergleichsstamm TG1 eine Nitrilaseexpression statt, die ohne L-Rhamnose nicht erfolgt.

40 Tab. 1

Probe	Rhamnose-zusatz [g/L]	Rhamnose-verbrauch	OD ₆₀₀	Umsatz Mandelonitril
1	2	-	5,9	+
1	0	-	5,7	-
2	2	+	11,9	+
2	0	-	8,0	-

27

- 1., E.coli JB1204 pDHE1650 in LB Amp Tet;
- 2., E.coli TG1 pDHE1650 in LB Amp (Positivkontrolle)

Testbedingungen: 10 mM Tris-HCl, 6 mM Mandelonitril, 40°C

5 Analyse: Probe mit 40 µl 1M HCl/ml abstoppen und nach Zellabtrennung mittels HPLC untersuchen wie in DE 19848129 beschrieben.

Beispiel 2: Herstellung des Rhamnose-defizienten Wirtsstammes
10 TG10 zur Produktion rekombinanter Proteine

Der für die Herstellung rekombinanter Biokatalysatoren genutzte Stamm TG1 wurde durch P1-Transduktion so modifiziert, dass er Rhamnose nicht mehr verstoffwechselt, aber das auf Rhamnose-Induktion basierende Expressionssystem der pJOE- und pDHE-Vektoren noch unbeeinträchtigt funktioniert (Bezeichnung dieses neuen Stammabkömmlings: TG10).

Um Fermentationsverfahren kostengünstig und mit hohen Ausbeuten fahren zu können, ist die Auswahl des E.coli-Stammes wichtig. Daher wurde als Wirtsstamm E. coli TG1 gewählt, der für produktive Hochdichtezellfermentationen bekannt ist (Korz et al. (1995) J Biotechnol 39:59-65). Die Rhamnose-Defizienz aus JB1204 wurde durch P1-Transduktion und Selektion auf Tetracyclin (15 µg/ml) 25 auf TG1 pDHE1650 übertragen (=TG10 pDHE1650= Lu10569).

2.1 P1-Transduktionsprotokoll zum Transfer der Rhamnose-Defizienz von JB1204 (rha14::Tn10) auf TG1

30 a) Herstellung des Donor-Lysates

- Den Donor, also JB1204 in 3 ml LB-Tet (15 µg/ml) ca. 15 h bei 37°C anziehen (Vorkultur).
- 3 ml LB-Tet + 5 mM CaCl₂ + 60 µl Vorkultur (=1:50) bis OD600= 35 0,3 - 0,5 bei 37°C inkubieren (ca. 45 min)
- + 100 µl (frisches) Lysat des Phagen P1, 10-120 min bis zur Zellyse gut weiterschütteln (Klärung, bei altem Lysat bis zu 5 h)
- + 60 µl Chloroform, 30 sec vortexen zur Abtötung restlicher 40 Zellen, Lagerung bei 4°C.

b) Infektion des Rezipienten

- Den Rezipienten, also TG1 pDHE1650 (=Lu9682) in 3 ml LB-Amp ca. 15 h bei 37°C anziehen (Vorkultur).
- 45 5 ml LB-Amp+ 5 mM CaCl₂ + 10 mM MgCl₂ + 10 mM MgSO₄ + 100 µl Vorkultur (=1:50) bis OD600= 0,3 - 0,5 bei 37 °C inkubieren (ca. 30 min), Rest Vorkultur auf Eis

28

- Vorkultur und Hauprkultur ernten, resuspendieren in 2,5 ml LB-Amp-Ca-Mg
- Je 2x 100 µl Rezipient mit mit 0, 5, 30, 100 µl Donor-Lysat versetzen sowie eine Kontrolle ohne Rezipient + 100 µl Donor-Lysat und 8 min bzw. 24 min ohne zu schütteln bei 30°C inkubieren (Infektion)
- + 100 µl 1 M Na-Citrat pH 7,0, 2 min bei 7000 rpm zentrifugieren, in 1 ml 0,1 M Citratpuffer pH 7,0 2-3x waschen und resuspendieren, 1 h 37°C ohne zu schütteln
- 10 - Ernte, resuspendieren in 100 µl 0,02 M Na-Citrat pH 7,0
- Je 80 µl ausplattieren auf LB-Amp-Tet sowie je 10 µl der Ansätze ohne Donorlysat-Zugabe auf LB-Amp, Inkubation Über Nacht bei 37°C
- Auf LB-Amp wird Rasen erhalten (Kontrolle). Kolonien von LB-Amp-Tet picken und Resistenzen, Rhamnose-Defizienz und -Induktionsfähigkeit, Aktivität verifizieren.

Parallel wurde auch TG1 pDHE1650 pAgro4 pHSG575, das Pendant zu TG1 pDHE1650 mit Chaperon-Coexpression (GroESL), transduziert 20 (+Spectinomycin 50 µg/ml und Chloramphenicol 10 µg/ml im Medium; Bezeichnung TG10 pDHE1650 pAgro4 pHSG575=Lu10571).

Nach Übernachtkultivierung der erhaltenen Klone in 3 ml LB-Ampicillin-Rhamnose (ca. 2 g/l)-Medium (± Tetracyclin 10 µg/ml) wurden 25 die optischen Dichten ($\lambda=600$ nm) der Kulturen bestimmt. Die HPLC-Analytik der Kulturüberstände zeigte, daß der erhaltene E. coli-Stamm TG10 pDHE1650 Rhamnose nicht verstoffwechseln kann. Die Zellen wurden anschließend in Puffer gewaschen und im Resting-Cell-Assay auf ihre Nitrilaseaktivität getestet (Tabelle 2).

30 Die Rhamnose-defizienten Klone zeigten eine ähnliche Nitril-verseifende Aktivität wie der entsprechender Vergleichsstamm (TG1pDHE1650). Die Rhamnose-Konzentration nahm bei den Klonen kaum ab.

35

40

45

29

Tab. 2

	Probe	Rhamnose Rest [g/L]	Zell-konz. [xfach]	Inkub.-zeit [min]	Säure [mM]	Aktivität (1x) [U/L]	OD ₆₀₀	Aktivität / OD ₆₀₀ MW [U/L]
5	Blank	-	0	60	0,01	0		
10	TG10 pDHE1650	1,71	0,01	60	1,02	1700	6,01	324
			0,05	10	1,10	2200		
15	TG1 pDHE1650	0	0,01	60	0,84	1400	7,90	180
			0,05	10	0,72	1440		
20	TG10 pDHE1650 pAgropHSG	1,67	0,01	60	0,78	1300	5,01	295
			0,05	10	0,83	1660		
25	TG1 pDHE1650 pAgropHSG	0,34	0,01	60	1,18	1967	7,51	297
			0,05	10	1,25	2500		

Testbedingungen:

10 mM Tris-HCl, 6 mM Mandelonitril, 40°C

Analyse:

Probe mit 40 µl 1M HCl/ml abstoppen und nach Zellabtrennung mittels HPLC untersuchen wie in DE 19848129 beschrieben
(1U = 1 µmol Mandelsäure/min)

Beispiel 3: "Curing" des Rhamnose-defizienten Wirtsstamm TG10 pDHE1650

Die Durchführung der Transduktion mit E.coli TG1 pDHE1650 bot den Vorteil der Selektion gegen den Ursprungsstamm JB1204 mit Ampicillin. Für weitere Arbeiten wurde jedoch ein plasmidfreier Wirtsstamm benötigt, d.h. das Plasmid pDHE1650 sollte aus TG10 pDHE1650 entfernt werden ("Curing" von TG10 pDHE1650). Dazu wurde E.coli TG10 pDHE1650 von Eis in 3 ml LB-Tet ohne Ampicillin angeimpft und ÜN bei 37 °C inkubiert. Daraus wurden eine 3 ml-Hauptkulturen 1:100 in LB-Tet animpft, die einem Hitzeschock unterzogen wurden (2,5 min 42°C). Nach 16 h Schütteln bei 37°C betrug die OD₆₀₀ der Kultur 1,3 (entspricht ca. 1,3x10⁹ Zellen/ml). Je 100 µl der Verdünnungsstufen 10⁻⁴ bis 10⁻⁷ wurden ausplattiert auf LB-Tet

30

und die erhaltenen Kolonien (560+140+15+0) überstempelt auf LB-Tet mit Ampicillin. Ein dort schwach gewachsener Klon wurde nochmals auf LB-Amp-Tet ausgestrichen. Er wuchs nicht auf LB-Amp-Tet und zeigte nach Minipräparation (LB-Tet-Anzucht) auch keine Plasmid-DNA. Dieser Ampicillin-sensitive Klon wird als TG10 bezeichnet (=Lu10568) und dient als Ausgangsstamm für neue Überexpressionsstämme.

Beispiel 4: Herstellung von rekombinanter L-Pantolacton-Hydrolase mit dem Rhamnose-defizienten Wirtsstamm E.coli TG10

Es wurden kompetente E. coli-TG10 Zellen hergestellt und mit dem Plasmid pDHE681, pAgro4 und pHSG575-transformiert (= Probe 1 in Tab.3). Nach Übernachtkultivierung bei 37 °C zeigten die Zellen eine hohe L-Pantolacton-verseifende Aktivität im Vergleich zum entsprechenden Kontrollstamm (TG1 pDHE681 pAgro4 pHSG575= Probe 2 in Tab.3), dessen maximale Aktivität i.d.R. nach 6-7 h Inkubation erreicht wird (ca. 1500 U/L) und durch längere Inkubation stark abfällt. Die Rhamnose (0,5 g/L) wurde von TG10 pDHE681 pAgro4 pHSG575 nicht verstoffwechselt.

Tab. 3

Probe	Rhamnose Rest [g/L]	OD ₆₀₀	Zell-konz. [xfach]	Inkub.-zeit [h]	Säure [mM]	Aktivität (1x) [U/L]	Aktivität / OD ₆₀₀ [U/L]
Blank	-		0	1,0	1,74	-	
1	0,52	6,35	0,2	1,0	29,9	2344,2	369,2
2	0	6,64	0,2	1,0	6,27	377,5	56,9

1, TG10 pDHE681 pAgro4 pHSG575; LB mit Ampicillin (Amp; 100 µg/ml) Tetracyclin (Tet 10 µg/ml), L-Rhamnose (Rha 0,5 g/l) und Isopropylthiogalactosid (IPTG 0,15 mM)

35 2, TG1 pDHE681 pAgro4 pHSG575; LB mit Ampicillin (Amp; 100 µg/ml), L-Rhamnose (Rha 0,5 g/l) und Isopropylthiogalactosid (IPTG 0,15 mM)

Der Test wurde detaillierter wiederholt. Die Zugabe von Tetracyclin (15 µg/ml) zum Medium ist zur Erhaltung der Rhamnose-Defizienz nicht notwendig.

31

Beispiel 5: Bestimmung der Abhängigkeit der Induktion von der L-Rhamnose-Konzentration

Der Stamm E.coli TG10 (pDHE1650, pAgro4, pHSG575) wurde analog zu
5 Beispiel 1 auf LB Ampicillin (100 mg/l), Chloramphenicol 10 mg/l,
Spectinomycin (50 mg/l), IPTG 0,15mM in Gegenwart verschiedener
Rhamnosemengen (0 bis 2 g/l Rhamnose) angezogen und auf seine
spezifische Nitrilaseaktivität hin untersucht (Doppelbestimmung).
Bereits eine Konzentration von 0,01 g/l L-Rhamnose ergibt eine im
10 Durchschnitt signifikante Induktion der Expression, während in
Abwesenheit von Rhamnose keinerlei signifikante Expression (über
die Enzymaktivität) ermittelt werden konnte.

Vgl. auch Fig.1:

- 15 A: Darstellung der relativen Aktivität (Rel. Act. %) im Verhältnis zu der L-Rhamnose-Konzentration (Conc. in g/l)
- 20 B: Darstellung der relativen spezifischen Aktivität (Rel. Spec. Act. %) im Verhältnis zu der L-Rhamnose-Konzentration (Conc. in g/l)

Tab. 4:

	Rhamnosekonz.	ÖD600	Rel. Aktiv.	Rel. spez. Akt. [g/l]
25	0,00	5,4	0,1%	0,1%
	0,01	6,2	66%	65%
	0,02	5,8	70%	73%
	0,04	5,7	85%	92%
	0,05	5,2	83%	98%
30	0,07	5,9	90%	93%
	0,10	6,0	97%	98%
	0,15	5,6	101%	111%
	0,20	5,6	100%	108%
	0,30	5,3	99%	115%
35	0,40	5,7	107%	114%
	0,50	6,2	102%	100%
	1,00	5,8	101%	108%
	2,00	6,1	100%	100%
	0 + Tet	4,7	0%	0%
40	0,5 + Tet	5,1	81%	98%
	2,0 + Tet	4,5	86%	117%

32

Beispiel 6: Analyse des Integrationsortes des Transposon im L-Rhamnose-Isomerase defizienten Stamm E.coli TG10

Um den Integrationsort des Transposons Tn10 näher zu charakterisieren, wurden die Rhamnose-Gene rhaT, rhaB, rhaA und rhaD via PCR (Pfu-Polymerase) im Vergleich von TG1 (pDHE681) und TG10 (pDHE681) untersucht. Bei Amplifikation von rhaA (L-Rhamnose-Isomerase) oder der Region rhaA-rhaD mit den Primern MKe259/260 bzw. MKe 258/259 wurde bei dem mutagenisierten Stamm TG10 im Unterschied zum Wildtypstamm TG1 keine spezifisches Amplifikat erhalten.

MKe258 5'-CCCAAGCTTGGATCATGTTGCTCCTTACAG (rhaD 3' Ende + HindIII)
MKe259 5'-GCGAATTGCATGACCACTCAACTGGAAACA (rhaA 5' Ende + EcoRI)

15 MKe260 5'-CCCAAGCTTACCCGGCGACTCAAATTT (rhaA 3' Ende + HindIII)

Beispiel 7: Herstellung eines L-Rhamnose-Isomerase defizienten E.coli Stamms mittels gezieltem Knockout

20 Zur Inaktivierung der L-Rhamnose-Isomerase (rhaA) wird das rhaA-Gen zunächst mit den Primern MKe001 und MKe002 amplifiziert und in pBluescriptSK⁺ kloniert (XbaI/HindIII-Verdau und Ligation). Anschließend wird durch Restriktionsverdau mit BamHI und Auffüllreaktion mit Klenow-Fragment sowie anschließender Ligation ein 25 Frameshift eingeführt und das entsprechende rha*-Fragment in den Gene-Replacement-Vektor pKO3 (Link et al. (1997) J Bacteriol 179:6228-6237) umkloniert. Der Knock out des rhaA-Gens in TG1(pDHE1650 durch homologe Rekombination mit dem rha*-Konstrukt wird nach Link et al. ((Link et al. (1997) J Bacteriol 30 179:6228-6237)) mittels Selektion auf Chloramphenicol bei 43°C, Replikatlattierung auf Saccharose bei 30°C und anschließender Verifizierung auf McConkey-Agar mit 1 g/L Rhamnose durchgeführt.

MKe001: 5'-ATAAGAATGCGGCCGCATGACCACTCAACTGGAAACA-3'

35 MKe002: 5'-CTAGCTCTAGATTACCCGGCGACTCAA-3'

Beispiel 8: Herstellung von rekombinanter Nitrilase mit dem Rhamnose-defizienten Wirtsstamm TG10

40 Die Fed-batch-Fermentation von TG10-Derivaten wie TG10 pDHE1650 pAgro4 pHSG575 erfolgt auf einem modifizierten Riesenberger-Medium mit Glycerin als C-Quelle und Rhamnose als Induktor zur Überexpression des Zielproteins, hier der Nitrilase. Mit dem Stamm wurden vergleichbare und höhere Zelldichten und Enzymaktivitäten erreichbar.

33

8.1 Fermentation von E. coli TG 1

Die Fermentation des *Escherichia coli* (TG1 pDHE1650 pAgro4 pHSG575) erfolgte im 20 L Bioreaktor. Der Reaktor mit 10L Arbeitsvolumen wurde mit 200 ml Vorkultur aus Schüttelkolben angeimpft. Das Vorkulturmedium entspricht dem Hauptkulturmumedium.

Medium:

40 g	Glycerin 99,5 %
10 15 g	Trypton
13,3 g	Kaliumdihydrogenphosphat
5 g	Hefeextrakt
4 g	Di-Ammoniumhydrogenphosphat
1,7 g	Citronensäure
15 1,1 g	Magnesiumsulfat Heptahydrat
1 mL	Spurenelementlösung SL Korz 1000 C
0,1 mL	Tego KS 911 Antischäummittel
0,062 g	Eisen(II)sulfat Heptahydrat
10 mg	Thiaminhydrochlorid
20 ad 1 L.	VE-Wasser

Das Medium wird 30 min bei 121°C sterilisiert. Anschließend werden 0,1 g Ampicillin steril zugesetzt

25 Spurenelementlösung

Citronensäure*H ₂ O	20 g
Kobalt(II)chlorid Hexachlorid (CoCl ₂ * 6H ₂ O)	2,5 g
Mangan(II)chlorid Tetrachlorid (MnCl ₂ * 4H ₂ O)	3,0 g
Kupfer(II)chlorid Dihydrat (CuCl ₂ * 2H ₂ O)	0,3 g

30 Borsäure (H₃BO₃)

Natriummolybdat Dihydrat (Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O)	0,5 g
Zinkacetat Dihydrat (Zn(CH ₃ COO) ₂ * 2H ₂ O)	2,6 g
ad 1L VE- H ₂ O	

35 Glycerinfeedlösung

2 L	VE-Wasser
211 g	Natriumsulfat
13,6 g	Eisen(II)sulfat Heptahydrat
8,8 kg	Glycerin 99,5 %
40 220 mL	Spurenelementlösung

Rhamnosefeedlösung

703 g	VE-Wasser
297 g	Rhamnose Monohydrat

34

Die Fermentation erfolgt bei einer Temperatur von 37°C. Die Begasung wird zwischen 8-30 L/min, die Rührerdrehzahl von 400 bis 1500 1/min geregelt um einen pO₂ von 20 % nicht zu unterschreiten. Nach 1 h Fermentationszeit wird die Kultur mit IPTG (0,15 mM) induziert. Anschließend werden 76 ml Rhamnosefeedlösung zugesetzt. Bei einem Unterschreiten der Rhamnosekonzentration im Fermenter von 1.0 g/L wird Rhamnosefeedlösung nachdosiert. Nach Verbrauch der vorgelegten Glycerinmenge wird kontinuierlich Glycerin zugefüttert.

10

Ergebnisse:

Zeit [h]	pO ₂ [%]	BTM [g/L]	Rhamnose [g/L]	dosierte Rhamnose- feedlösung [g]	Glycerin [g/L]
	[h]	%	[g/L]	[g/L]	[g/L]
0	0	0	0	0	40.0
2	75.8	2.3	1.70	76	35.9
5	20.5	7.5	1.54	115	33.6
8	33.7	17.3	1.96	244	25.4
11	39.3	15.7	3.11	365	17.0
14	22.6	18.8	2.71	364	8.6
17	30.1	21.4	1.87	404	0
20	35.1	24.8	1.36	474	0
23	21.5	31.8	1.18	673	0
26	23.9	28.7	1.80	970	0
29	36.4	42.2	0.48	1234	0
32	28.5	38.7	1.20	1639	0
35	29.8	47.0	1.22	2033	0
38	44.3	49.2	1.19	2474	0
41	47.6	45.4	1.45	2879	0
44	46.2	45.2	1.80	3237	0

30

Aktivität nach 44h: 57200 U/L

8.2 Fermentation von E. coli TG 10

35 Die Fermentation des *Escherichia coli* TG10 (pDHE1650 pAgro4 pHSG575) erfolgte nach derselben Vorschrift wie in Beispiel 1 mit dem Unterschied, dass die Induktion mit 18,5 g Rhamnosefeedlösung vorgenommen wurde. Es wurde keine Nachdosierung der Rhamnose vorgenommen.

40

45

Ergebnisse:

Zeit	pO2	BTM	Rhamnose	dosierte Rhamnose- feedlösung	Glycerin
	[h]	[%]	[g/L]	[g]	[g/L]
5	0	0	0.00	0	40.0
	2	71.4	2.7	0.58	38.6
	5	20.7	7.0	0.59	36.5
	8	21.7	13.2	0.59	26.4
	11	31.1	16.9	0.57	13.2
10	14	44.6	19.0	0.60	0
	17	50.5	24.0	0.58	0
	20	35.9	26.1	0.57	0
	23	33.9	33.4	0.58	0
	26	40.4	36.0	0.57	0
	29	38.2	40.8	0.55	0
15	32	34.3	45.3	0.58	0
	35	45.7	48.7	0.50	0
	38	40.0	50.7	0.50	0
	41	31.8	52.5	0.44	0
	44	29.5	50.0	0.44	0
20	Aktivität nach 44h: 59200 U/L				

8.3 Aktivitätstest:

Zu 880 µl Natrium-Kalium-Phosphatpuffer (10mM) werden 50 µl Zellsuspension pipettiert und auf 30°C temperiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 20 µl methanolischer Mandelonitrillösung (12%) gestartet. Nach 10min wird er Enzymreaktion durch Zugabe von 50

µl 1M HC gestoppt. Die Zellmasse wird abzentrifugiert und die Mandelsäurekonzentration im Überstand wird per HPLC (ODS Hypersil 100*2,0 mm, Laufmittel: 75% H₃PO₄ (14.8mM) / 25% Methanol; Flußrate: 0.5 ml/min; Injektionsvolumen: 2 µl; Säulentemperatur: 40°C; Detektion: 210nm; Retentionzeit Mandelsäure: 0.9 min) gemessen.

8.4 Bestimmung der Rhamnosekonzentration:

Zur online Probenahme am Fermenter bedient man sich eines Kermikfilters und einer kontinuierlich betriebenen Schlauchpumpe.

Die Programmierung der HPLC-Anlage erfolgt so, daß nach jeder abgeschlossenen Analyse eine erneute Einspritzung erfolgt. Dazwischen wird das Filtrat aus dem Fermenter in ein Abfallgefäß gepumpt.

Chromatographische Bedingungen:

Säule: HPX 87 H, 7,8 x 300 mm

Eluent: 0,005 M H₂SO₄

Flußrate: 0,5 mL/min

45 Injektionsvolumen: 1 µL

Säulentemperatur: 55°C

Detektion: RI

L-Rhamnose-induzierbare Expressionssysteme

Zusammenfassung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Expression von Nukleinsäuresequenzen in prokaryontischen Wirtszellen, wobei man mindestens ein in besagten Wirtszellen episomal replizierbares DNA-Konstrukt umfassend eine zu exprimierende Nukleinsäuresequenz unter transkriptioneller Kontrolle eines L-Rhamnose-induzierbaren Promotors, wobei besagter Promotor in Bezug auf besagte Nukleinsäuresequenz heterolog ist, in besagte Wirtszellen einbringt und die Expression besagter Nukleinsäuresequenz durch Zugabe von L-Rhamnose induziert, dadurch gekennzeichnet, dass die prokaryontische Wirtszelle zumindest defizient ist in Bezug auf eine L-Rhamnose-Isomerase.

20

25

30

35

40

45

1

SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Aktiengesellschaft
<120> L-Rhamnose-induzierbare Expressionssysteme
<130> AE20020689
<140>
<141>
<160> 19
<170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1
<211> 2046
<212> DNA
<213> Escherichia coli
<220>
<221> misc_feature
<222> (288)..(1121)
<223> coding for rhaS (positive regulator of rhaBAD operon)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1108)..(2043)
<223> coding for rhaR (positive regulator of rhaRS operon)

<220>
<221> protein_bind
<222> (56)..(72)
<223> potential RhaS binding site

<220>
<221> protein_bind
<222> (89)..(105)
<223> potential RhaS binding site

<220>
<221> protein_bind
<222> (172)..(203)
<223> potential RhaR binding site

<220>
<221> protein_bind
<222> (210)..(241)
<223> potential RhaR binding site

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)
<223> potential start of transcription (complement)

<400> 1
aatgtgatcc tgctgaattt cattacgacc agtctaaaaa gcgcctgaat tcgcgacctt 60
ctcgttactg acaggaaaat gggccattgg caaccaggg aagatgaacg tgatgtatgtt 120
cacaatttgc tgaattgtgg tgatgtatg ctcaccgcatttctctgaaaa ttcacgcgtt 180
atcttgaaaa atcgacgttt tttacgtgg tttccgtcga aaattttaagg taagaacctg 240
acctcgat tactatccg ccgtgttgac gacatcgaa ggccagtatg accgtattac 300
atagtgtgga ttttttccg tctggtaacg cgtccgtggc gatagaaccc cggctccgc 360
aggcggattt tcctgaacat catcatgatt ttcatgaaat tgtgattgtc gaacatggca 420
cggttattca tgtgtttaat gggcagccct ataccatcac cggtggcacg gtctgtttcg 480

tacgcgatca tgatcgcat ctgttatgaac ataccataa tctgtgtctg accaatgtgc 540
 tgtatcgctc gcccggatcgta ttccagtttc tcgccccggct gaatcagttt ctgccacaag 600
 agctggatgg gcagtatccg tctcaactggc gcgttaacca cagcgtattt cagcagggtgc 660
 gacagcttgt tgcacagatg gaacagcagg aagggggaaaa tgatttaccc tcgaccgcca 720
 gtcgcgagat cttgtttatg caattactgc tcttgcgtcg taaaagcagt ttgcaggaga 780
 acctggaaaaa cagcgcataa cgtctcaact tgcttctggc ctgctggag gaccattttg 840
 ccgatgaggat gaattgggat gcccgtggcg atcaattttc tcttcaactg cgtacgctac 900
 atcggcagct taagcagcaa acgggactga cgcctcagcg atacctgaac cgccctgcac 960
 tgatgaaagc ccgacatctg ctacgcccaca gcgaggccag cgttactgac atcgcctatc 1020
 gctgtggatt cagcgcacatg aaccactttt cgacgctttt tcgcccggag tttactgg 1080
 caccgcgtga tattcgccag ggacgggatg gcttctgca ataacgcgaa tcttctcaac 1140
 gtatttgcgtac gccatattgc gaataatcaa cttcggttc tggccggaggt agccacgggt 1200
 gcgcatcagt taaaacttct caaagatgat tttttgcca gcgaccagca ggcagtcgct 1260
 gtggctgacc gttatccgca agatgtctt gctgaacata cacatgattt ttgtgagctg 1320
 gtgattgtct ggccggtaa tggcctgcat gtactcaacg atcgcctta tcgcattacc 1380
 cgtggcgatc tcttttacat tcatgctgac gataaacact cctacgcttc cgttaacgat 1440
 ctggttttgc agaatattat ttattggccg gagcgtctga agctgaatct tgactggcag 1500
 gggggcgttcc cgggatttaa cggcagcga gggcaaccac actggcgctt aggtacgat 1560
 gggatggcgcc aggcgcggca gtttatcggt cagcttgagc atgaaagtag tcagcatgtg 1620
 ccgtttgcta acgaaatggc tgagttgtc ttcggggcagt tggatgtgtt gctgaatcgc 1680
 catcgtaaca ccagtgattc gttgcccaca acatccagcg aaacggttgct ggataagctg 1740
 attaccggc tggccggctag cctgaaaagt cccttgcgc tggataaatt ttgtgatgag 1800
 gcatcggtca gtgagcgcgt tttgcgtcag caatttgcgc agcagactgg aatgaccatc 1860
 aatcaatatac tgcgacagatg cagagtgtgt catgcgcaat atttctcca gcatagccgc 1920
 ctgttaatca gtgatatttc gaccgaatgt ggcttgaag atagtaacta ttttcgggt 1980
 gtgttaccc gggaaaccgg gatgacgccc agccagtggc gtcatactcaa ttgcagaaaa 2040
 gattaa 2046

<210> 2

<211> 287

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(287)

<223> rhaBAD promoter fragment containing rhaS and rhaR binding sites

<400> 2

actggcctcc tgatgtcgta aacacggcga aatagtaatc acgagggtcag gttcttaccc 60
 taaaatttcg acgaaaaacc acgtaaaaaaaaa cgtcgattt tcaagataca gcgtaattt 120
 tcaggaaatg cggcgacat cacatcacca caattcagca aattgtgaac atcatcacgt 180
 tcatcttcc ctgggtgcca atggccattt ttcctgtcg taacgagaag gtcgcgaatt 240
 caggcgctt ttagactggc cgtaatgaaa ttccggatc tcacatt 287

<210> 3

<211> 125

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(125)

<223> rhaBAD promoter fragment containing RhaS binding site

<400> 3

ttgtgaacat catcacgttc atcttccct gggtgccaat ggccatattt cctgtcagta 60
 acgagaaggt cgcgaaattca ggcgtttttt agactggcgtg taatgaaatt cagcaggatc 120
 acatt 125

<210> 4
 <211> 123
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli
 <220>
 <221> promoter
 <222> (1)...(123)
 <223> rhaBAD promoter fragment containing RhaS binding site
 <400> 4
 atcaccacaa ttcagcaaat tgtgaacatc atcacgttca tctttccctg gttgccaatg 60
 gcccattttc ctgtcagtaa cgagaaggtc gcgaatttag ggcgtttta gactggcgt 120
 aat 123
 <210> 5
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)...(51)
 <223> palindromic RhaS binding site of rhaBAD promoter
 <400> 5
 atctttccct ggttgccaat ggccatattt cctgtcagta acgagaaggt c 51
 <210> 6
 <211> 1071
 <212> DNA
 <213> Alcaligenes faecalis
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(1068)
 <223> coding for nitrilase
 <400> 6
 atg cag aca aga aaa atc gtc cgg gca gcc gcc gta cag gcc tct 48
 Met Gln Thr Arg Lys Ile Val Arg Ala Ala Val Gln Ala Ala Ser
 1 5 10 15
 ccc aac tac gat ctg gca acg ggt gtt gat aaa acc att gag ctg gct 96
 Pro Asn Tyr Asp Leu Ala Thr Gly Val Asp Lys Thr Ile Glu Leu Ala
 20 25 30
 cgt cag gcc cgc gat gag ggc tgt gac ctg atc gtg ttt ggt gaa acc 144
 Arg Gln Ala Arg Asp Glu Gly Cys Asp Leu Ile Val Phe Gly Glu Thr
 35 40 45
 tgg ctg ccc gga tat ccc ttc cac gtc tgg ctg ggc gca ccg gcc tgg 192
 Trp Leu Pro Gly Tyr Pro Phe His Val Trp Leu Gly Ala Pro Ala Trp
 50 55 60
 tcg ctg aaa tac agt gcc cgc tac tat gcc aac tcg ctc tcg ctg gac 240
 Ser Leu Lys Tyr Ser Ala Arg Tyr Ala Asn Ser Leu Ser Leu Asp
 65 70 75 80
 agt gca gag ttt caa cgc att gcc cag gcc gca cgg acc ttg ggt att 288
 Ser Ala Glu Phe Gln Arg Ile Ala Gln Ala Ala Arg Thr Leu Gly Ile
 85 90 95
 ttc atc gca ctg ggt tat agc gag cgc agc ggc agc ctt tac ctg 336
 Phe Ile Ala Leu Gly Tyr Ser Glu Arg Ser Gly Gly Ser Leu Tyr Leu
 100 105 110

ggc caa tgc ctg atc gac gac aag ggc gag atg ctg tgg tcg cgt cgc.	384
Gly Gln Cys Leu Ile Asp Asp Lys Gly Glu Met Leu Trp Ser Arg Arg	
115 120 125	
aaa ctc aaa ccc acg cat gta gag cgc acc gta ttt ggt gaa ggt tat	432
Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Thr Val Phe Gly Glu Gly Tyr	
130 135 140	
gcc cgt gat ctg att gtg tcc gac aca gaa ctg gga cgc gtc ggt gct	480
Ala Arg Asp Leu Ile Val Ser Asp Thr Glu Leu Gly Arg Val Gly Ala	
145 150 155 160	
cta tgc tgc tgg gag cat ttg tcg ccc ttg agc aag tac gcg ctg tac	528
Leu Cys Cys Trp Glu His Leu Ser Pro Leu Ser Lys Tyr Ala Leu Tyr	
165 170 175	
tcc cag cat gaa gcc att cac att gct gcc tgg ccg tcg ttt tcg cta	576
Ser Gln His Ala Ile His Ala Ala Trp Pro Ser Phe Ser Leu	
180 185 190	
tac agc gaa cag gcc cac gac ctc agt gcc aag gtg aac atg gct gcc	624
Tyr Ser Glu Gln Ala His Ala Leu Ser Ala Lys Val Asn Met Ala Ala	
195 200 205	
tcg caa atc tat tcg gtt gaa ggc cag tgc ttt acc atc gcc gcc agc	672
Ser Gln Ile Tyr Ser Val Glu Gly Gln Cys Phe Thr Ile Ala Ala Ser	
210 215 220	
agt gtg gtc acc caa gag acg cta gac atg ctg gaa gtg ggt gaa cac	720
Ser Val Val Thr Gln Glu Thr Leu Asp Met Leu Glu Val Gly Glu His	
225 230 235 240	
aac gcc ccc ttg ctg aaa gtg ggc ggc ggc agt tcc atg att ttt gcg	768
Asn Ala Pro Leu Leu Lys Val Gly Gly Ser Ser Met Ile Phe Ala	
245 250 255	
ccg gac gga cgc aca ctg gct ccc tac ctg cct cac gat gcc gag ggc	816
Pro Asp Gly Arg Thr Leu Ala Pro Tyr Leu Pro His Asp Ala Glu Gly	
260 265 270	
ttg atc att gcc gat ctg aat atg gag gag att gcc ttc gcc aaa gcg	864
Leu Ile Ile Ala Asp Leu Asn Met Glu Glu Ile Ala Phe Ala Lys Ala	
275 280 285	
atc aat gac ccc gta ggc cac tat tcc aaa ccc gag gcc acc cgt ctg	912
Ile Asn Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Lys Pro Glu Ala Thr Arg Leu	
290 295 300	
gtg ctg gac ttg ggg cac cga gac ccc atg act cgg gtg cac tcc aaa	960
Val Leu Asp Leu Gly His Arg Asp Pro Met Thr Arg Val His Ser Lys	
305 310 315 320	
agc gtg acc agg gaa gag gct ccc gag caa ggt gtg caa agc aag att	1008
Ser Val Thr Arg Glu Glu Ala Pro Glu Gln Gly Val Gln Ser Lys Ile	
325 330 335	
gcc tca gtc gct atc agc cat cca cag gac tcg gac aca ctg cta gtg	1056
Ala Ser Val Ala Ile Ser His Pro Gln Asp Ser Asp Thr Leu Leu Val	
340 345 350	
caa gag ccg tct tga	1071
Gln Glu Pro Ser	
355	

<212> PRT

<213> Alcaligenes faecalis

<400> 7

Met	Gln	Thr	Arg	Lys	Ile	Val	Arg	Ala	Ala	Ala	Val	Gln	Ala	Ala	Ser
1					5						10				15
Pro	Asn	Tyr	Asp	Leu	Ala	Thr	Gly	Val	Asp	Lys	Thr	Ile	Glu	Leu	Ala
					20						25				30
Arg	Gln	Ala	Arg	Asp	Glu	Gly	Cys	Asp	Leu	Ile	Val	Phe	Gly	Glu	Thr
					35					40					45
Trp	Leu	Pro	Gly	Tyr	Pro	Phe	His	Val	Trp	Leu	Gly	Ala	Pro	Ala	Trp
					50					55					60
Ser	Leu	Lys	Tyr	Ser	Ala	Arg	Tyr	Tyr	Ala	Asn	Ser	Leu	Ser	Leu	Asp
					65					70			75		80
Ser	Ala	Glu	Phe	Gln	Arg	Ile	Ala	Gln	Ala	Ala	Arg	Thr	Leu	Gly	Ile
					85					90					95
Phe	Ile	Ala	Leu	Gly	Tyr	Ser	Glu	Arg	Ser	Gly	Gly	Ser	Leu	Tyr	Leu
					100					105					110
Gly	Gln	Cys	Leu	Ile	Asp	Asp	Lys	Gly	Glu	Met	Leu	Trp	Ser	Arg	Arg
					115					120					125
Lys	Leu	Lys	Pro	Thr	His	Val	Glu	Arg	Thr	Val	Phe	Gly	Glu	Gly	Tyr
					130					135					140
Ala	Arg	Asp	Leu	Ile	Val	Ser	Asp	Thr	Glu	Leu	Gly	Arg	Val	Gly	Ala
					145					150			155		160
Leu	Cys	Cys	Trp	Glu	His	Leu	Ser	Pro	Leu	Ser	Lys	Tyr	Ala	Leu	Tyr
					165					170					175
Ser	Gln	His	Ala	Ile	His	Ile	Ala	Ala	Trp	Pro	Ser	Phe	Ser	Leu	
					180					185			190		
Tyr	Ser	Glu	Gln	Ala	His	Ala	Leu	Ser	Ala	Lys	Val	Asn	Met	Ala	Ala
					195					200			205		
Ser	Gln	Ile	Tyr	Ser	Val	Glu	Gly	Gln	Cys	Phe	Thr	Ile	Ala	Ala	Ser
					210					215			220		
Ser	Val	Val	Thr	Gln	Glu	Thr	Leu	Asp	Met	Leu	Glu	Val	Gly	Glu	His
					225					230			235		240
Asn	Ala	Pro	Leu	Leu	Lys	Val	Gly	Gly	Ser	Ser	Met	Ile	Phe	Ala	
					245					250					255
Pro	Asp	Gly	Arg	Thr	Leu	Ala	Pro	Tyr	Leu	Pro	His	Asp	Ala	Glu	Gly
					260					265					270
Leu	Ile	Ile	Ala	Asp	Leu	Asn	Met	Glu	Glu	Ile	Ala	Phe	Ala	Lys	Ala
					275					280			285		
Ile	Asn	Asp	Pro	Val	Gly	His	Tyr	Ser	Lys	Pro	Glu	Ala	Thr	Arg	Leu
					290					295			300		
Val	Leu	Asp	Leu	Gly	His	Arg	Asp	Pro	Met	Thr	Arg	Val	His	Ser	Lys
					305					310			315		320
Ser	Val	Thr	Arg	Glu	Glu	Ala	Pro	Glu	Gln	Gly	Val	Gln	Ser	Lys	Ile
					325					330					335
Ala	Ser	Val	Ala	Ile	Ser	His	Pro	Gln	Asp	Ser	Asp	Thr	Leu	Leu	Val
					340					345					350

Gln Glu Pro Ser
355

<210> 8
 <211> 1260
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1257)
 <223> coding for rhaA (L-rhamnose isomerase)
 <400> 8
 atg acc actcaa ctg gaa cag gcc tgg gag cta gcg aaa cag cgt ttc 48
 Met Thr Thr Gln Leu Glu Gln Ala Trp Glu Leu Ala Lys Gln Arg Phe
 1 5 10 15
 gcg gcg gtg ggg att gat gtc gag gag ggc ctg cgc caa ctt gat cgt 96
 Ala Ala Val Gly Ile Asp Val Glu Glu Ala Leu Arg Gln Leu Asp Arg
 20 25 30
 tta ccc gtt tca atg cac tgc tgg cag ggc gat gat gtt tcc ggt ttt 144
 Leu Pro Val Ser Met His Cys Trp Gln Gly Asp Asp Val Ser Gly Phe
 35 40 45
 gaa aac ccg gaa ggt tcg ctg acc ggg ggg att cag gcc aca ggc aat 192
 Glu Asn Pro Glu Gly Ser Leu Thr Gly Gly Ile Gln Ala Thr Gly Asn
 50 55 60
 tat ccg ggc aaa gcg cgt aat gcc agt gag cta cgt gcc gat ctg gaa 240
 Tyr Pro Gly Lys Ala Arg Asn Ala Ser Glu Leu Arg Ala Asp Leu Glu
 65 70 75 80
 cag gct atg cgg ctg att ccg ggg ccg aaa ccg ctt aat tta cat gcc 288
 Gln Ala Met Arg Leu Ile Pro Gly Pro Lys Arg Leu Asn Leu His Ala
 85 90 95
 atc tat ctg gaa tca gat acg cca gtc tcg cgc gac cag atc aaa cca 336
 Ile Tyr Leu Glu Ser Asp Thr Pro Val Ser Arg Asp Gln Ile Lys Pro
 100 105 110
 gag cac ttc aaa aac tgg gtt gaa tgg gcg aaa gcc aat cag ctc ggt 384
 Glu His Phe Lys Asn Trp Val Glu Trp Ala Lys Ala Asn Gln Leu Gly
 115 120 125
 ctg gat ttt aac ccc tcc tgc ttt tcg cat ccg cta agc gcc gat ggc 432
 Leu Asp Phe Asn Pro Ser Cys Phe Ser His Pro Leu Ser Ala Asp Gly
 130 135 140
 ttt acg ctt tcc cat gcc gac gac att cgc cag ttc tgg att gat 480
 Phe Thr Leu Ser His Ala Asp Asp Ser Ile Arg Gln Phe Trp Ile Asp
 145 150 155 160
 cac tgc aaa gcc agc cgt cgc gtt tcg gcc tat ttt ggc gag caa ctc 528
 His Cys Lys Ala Ser Arg Arg Val Ser Ala Tyr Phe Gly Glu Gln Leu
 165 170 175
 ggc aca cca tcg gtg atg aac atc tgg atc ccg gat ggt atg aaa gat 576
 Gly Thr Pro Ser Val Met Asn Ile Trp Ile Pro Asp Gly Met Lys Asp
 180 185 190
 atc acc gtt gac cgt ctc gcc ccg cgt cag cgt ctg ctg gca gca ctg 624
 Ile Thr Val Asp Arg Leu Ala Pro Arg Gln Arg Leu Leu Ala Ala Leu
 195 200 205

gat gag gtg atc agc gag aag cta aac cct gcg cac cat atc gac gcc	672
Asp Glu Val Ile Ser Glu Lys Leu Asn Pro Ala His His Ile Asp Ala	
210 215 220	
gtt gag agc aaa ttg ttt ggc att ggc gca gag agc tac acg gtt ggc	720
Val Glu Ser Lys Leu Phe Gly Ile Gly Ala Glu Ser Tyr Thr Val Gly	
225 230 235 240	
tcc aat gag ttt tac atg ggg tat gcc acc agc cgc cag act gcg ctg	768
Ser Asn Glu Phe Tyr Met Gly Tyr Ala Thr Ser Arg Gln Thr Ala Leu	
245 250 255	
tgc ctg gac gcc ggg cac ttc cac ccg act gaa gtg att tcc gac aag	816
Cys Leu Asp Ala Gly His Phe His Pro Thr Glu Val Ile Ser Asp Lys	
260 265 270	
att tcc gcc gcc atg ctg tat gtg ccg cag ttg ctg ctg cac gtc agc	864
Ile Ser Ala Ala Met Leu Tyr Val Pro Gln Leu Leu Leu His Val Ser	
275 280 285	
cgt ccg gtt cgc tgg gac agc gat cac gta gtg ctg ctg gat gat gaa	912
Arg Pro Val Arg Trp Asp Ser Asp His Val Val Leu Leu Asp Asp Glu	
290 295 300	
acc cag gca att gcc agt gag att gtg cgt cac gat ctg ttt gac cgg	960
Thr Gln Ala Ile Ala Ser Glu Ile Val Arg His Asp Leu Phe Asp Arg	
305 310 315 320	
gtg cat atc ggc ctt gac ttc ttc gat gcc tct atc aac cgc att gcc	1008
Val His Ile Gly Leu Asp Phe Asp Ala Ser Ile Asn Arg Ile Ala	
325 330 335	
gcf tgg gtc att ggt aca cgc aat atg aaa aaa gcc ctg ctg cgt gcf	1056
Ala Trp Val Ile Gly Thr Arg Asn Met Lys Lys Ala Leu Leu Arg Ala	
340 345 350	
ttg ctg gaa cct acc gct gac gtg cgc aag ctg gaa gcf gcf ggc gat	1104
Leu Leu Glu Pro Thr Ala Asp Val Arg Lys Leu Glu Ala Ala Gly Asp	
355 360 365	
tac act gcf cgt ctg gca ctg ctg gaa gag cag aaa tcg ttg ccf tgg	1152
Tyr Thr Ala Arg Leu Ala Leu Glu Gln Lys Ser Leu Pro Trp	
370 375 380	
cag gcf gtc tgg gaa atg tat tgc caa cgt cac gat acf cca gca ggt	1200
Gln Ala Val Trp Glu Met Tyr Cys Gln Arg His Asp Thr Pro Ala Gly	
385 390 395 400	
agc gaa tgg ctg gag agc gtg cgg gct tat gag aaa gaa att ttg agt	1248
Ser Glu Trp Leu Glu Ser Val Arg Ala Tyr Glu Lys Glu Ile Leu Ser	
405 410 415	
cgc cgc ggg taa	1260
Arg Arg Gly	
<210> 9	
<211> 419	
<212> PRT	
<213> Escherichia coli	
<400> 9	
Met Thr Thr Gln Leu Glu Gln Ala Trp Glu Leu Ala Lys Gln Arg Phe	
1 5 10 15	
Ala Ala Val Gly Ile Asp Val Glu Glu Ala Leu Arg Gln Leu Asp Arg	
20 25 30	

8

Leu Pro Val Ser Met His Cys Trp Gln Gly Asp Asp Val Ser Gly Phe
35 40 45

Glu Asn Pro Glu Gly Ser Leu Thr Gly Gly Ile Gln Ala Thr Gly Asn
50 55 60

Tyr Pro Gly Lys Ala Arg Asn Ala Ser Glu Leu Arg Ala Asp Leu Glu
65 70 75 80

Gln Ala Met Arg Leu Ile Pro Gly Pro Lys Arg Leu Asn Leu His Ala
85 90 95

Ile Tyr Leu Glu Ser Asp Thr Pro Val Ser Arg Asp Gln Ile Lys Pro
100 105 110

Glu His Phe Lys Asn Trp Val Glu Trp Ala Lys Ala Asn Gln Leu Gly
115 120 125

Leu Asp Phe Asn Pro Ser Cys Phe Ser His Pro Leu Ser Ala Asp Gly
130 135 140

Phe Thr Leu Ser His Ala Asp Asp Ser Ile Arg Gln Phe Trp Ile Asp
145 150 155 160

His Cys Lys Ala Ser Arg Arg Val Ser Ala Tyr Phe Gly Glu Gln Leu
165 170 175

Gly Thr Pro Ser Val Met Asn Ile Trp Ile Pro Asp Gly Met Lys Asp
180 185 190

Ile Thr Val Asp Arg Leu Ala Pro Arg Gln Arg Leu Leu Ala Ala Leu
195 200 205

Asp Glu Val Ile Ser Glu Lys Leu Asn Pro Ala His His Ile Asp Ala
210 215 220

Val Glu Ser Lys Leu Phe Gly Ile Gly Ala Glu Ser Tyr Thr Val Gly
225 230 235 240

Ser Asn Glu Phe Tyr Met Gly Tyr Ala Thr Ser Arg Gln Thr Ala Leu
245 250 255

Cys Leu Asp Ala Gly His Phe His Pro Thr Glu Val Ile Ser Asp Lys
260 265 270

Ile Ser Ala Ala Met Leu Tyr Val Pro Gln Leu Leu His Val Ser
275 280 285

Arg Pro Val Arg Trp Asp Ser Asp His Val Val Leu Leu Asp Asp Glu
290 295 300

Thr Gln Ala Ile Ala Ser Glu Ile Val Arg His Asp Leu Phe Asp Arg
305 310 315 320

Val His Ile Gly Leu Asp Phe Phe Asp Ala Ser Ile Asn Arg Ile Ala
325 330 335

Ala Trp Val Ile Gly Thr Arg Asn Met Lys Lys Ala Leu Leu Arg Ala
340 345 350

Leu Leu Glu Pro Thr Ala Asp Val Arg Lys Leu Glu Ala Ala Gly Asp
355 360 365

Tyr Thr Ala Arg Leu Ala Leu Leu Glu Glu Gln Lys Ser Leu Pro Trp
370 375 380

Gln Ala Val Trp Glu Met Tyr Cys Gln Arg His Asp Thr Pro Ala Gly
385 390 395 400

Ser Glu Trp Leu Glu Ser Val Arg Ala Tyr Glu Lys Glu Ile Leu Ser
405 410 415

Arg Arg Gly

<210> 10
 <211> 1470
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(1467)
 <223> coding for rhaB (rhammolukinase)
 <400> 10 48
 atg acc ttt cgc aat tgt gtc gcc gtc gat ctc ggc gca tcc agt ggg
 Met Thr Phe Arg Asn Cys Val Ala Val Asp Leu Gly Ala Ser Ser Gly
 1 5 10 15
 cgc gtg atg ctg gcg cgt tac gag cgt gaa tgc cgc agc ctg acg ctg 96
 Arg Val Met Leu Ala Arg Tyr Glu Arg Glu Cys Arg Ser Leu Thr Leu
 20 25 30
 cgc gaa atc cat cgt ttt aac aat ggg ctg cat agt cag aac ggc tat 144
 Arg Glu Ile His Arg Phe Asn Asn Gly Leu His Ser Gln Asn Gly Tyr
 35 40 45
 gtc acc tgg gat gtg gat agc ctt gaa agt gcc att cgc ctt gga tta 192
 Val Thr Trp Asp Val Asp Ser Leu Glu Ser Ala Ile Arg Leu Gly Leu
 50 55 60
 aac aag gtg tgc gag gaa ggg att cgt atc gat agc att ggg att gat 240
 Asn Lys Val Cys Glu Glu Gly Ile Arg Ile Asp Ser Ile Gly Ile Asp
 65 70 75 80
 acc tgg ggc gtg gac ttt gtg ctg ctc gac caa cag ggt cag cgt gtg 288
 Thr Trp Gly Val Asp Phe Val Leu Leu Asp Gln Gln Gly Gln Arg Val
 85 90 95
 ggc ctg ccc gtt gct tat cgc gat agc cgc acc aat ggc cta atg gcg 336
 Gly Leu Pro Val Ala Tyr Arg Asp Ser Arg Thr Asn Gly Leu Met Ala
 100 105 110
 cag gca caa caa caa ctc ggc aaa cgc gat att tat caa cgt agc ggc 384
 Gln Ala Gln Gln Leu Gly Lys Arg Asp Ile Tyr Gln Arg Ser Gly
 115 120 125
 atc cag ttt ctg ccc ttc aat acg ctt tat cag ttg cgt gcg ctg acg 432
 Ile Gln Phe Leu Pro Phe Asn Thr Leu Tyr Gln Leu Arg Ala Leu Thr
 130 135 140
 gag caa caa cct gaa ctt att cca cac att gct cac gct ctg ctg atg 480
 Glu Gln Gln Pro Glu Leu Ile Pro His Ile Ala His Ala Leu Leu Met
 145 150 155 160
 ccg gat tac ttc agt tat cgc ctg acc ggc aag atg aac tgg gaa tat 528
 Pro Asp Tyr Phe Ser Tyr Arg Leu Thr Gly Lys Met Asn Trp Glu Tyr
 165 170 175
 acc aac gcc acg acc acg caa ctg gtc aat atc aat agc gac gac tgg 576
 Thr Asn Ala Thr Thr Gln Leu Val Asn Ile Asn Ser Asp Asp Trp
 180 185 190
 gac gag tcg cta ctg gcg tgg agc ggg gcc aac aaa gcc tgg ttt ggt 624
 Asp Glu Ser Leu Leu Ala Trp Ser Gly Ala Asn Lys Ala Trp Phe Gly
 195 200 205

10

cgc ccg acg cat ccg ggt aat gtc ata ggt cac tgg att tgc ccg cag Arg Pro Thr His Pro Gly Asn Val Ile Gly His Trp Ile Cys Pro Gln	210	215	220	672
ggt aat gag att cca gtg gtc gcc gtt gcc agc cat gat acc gcc agc Gly Asn Glu Ile Pro Val Val Ala Val Ala Ser His Asp Thr Ala Ser	225	230	235	240
gct gtt atc gcc tcg ccg tta aac ggc tca cgt gct gct tat ctc tct Ala Val Ile Ala Ser Pro Leu Asn Gly Ser Arg Ala Ala Tyr Leu Ser	245.	250	255	768
tct ggc acc tgg tca ttg atg ggc ttc gaa agc cag acg cca ttt acc Ser Gly Thr Trp Ser Leu Met Gly Phe Glu Ser Gln Thr Pro Phe Thr	260	265	270	816
aat gac acg gca ctg gca gcc aac atc acc aat gaa ggc ggg gcg gaa Asn Asp Thr Ala Leu Ala Ala Asn Ile Thr Asn Glu Gly Gly Ala Glu	275	280	285	864
ggt cgc tat cgg gtg ctg aaa aat att atg ggc tta tgg ctg ctt cag Gly Arg Tyr Arg Val Leu Lys Asn Ile Met Gly Leu Trp Leu Leu Gln	290	295	300	912
cga gtg ctt cag gag cag caa atc aac gat ctt ccg gcg ctt atc tcc Arg Val Leu Gln Glu Gln Ile Asn Asp Leu Pro Ala Leu Ile Ser	305	310	315	320
gct aca cag gca ctt ccg gct tgc cgc ttc att atc aat ccc aat gac Ala Thr Gln Ala Leu Pro Ala Cys Arg Phe Ile Ile Asn Pro Asn Asp	325	330	335	1008
gat cgc ttt att aat cct gag acg atg tgc agc gaa att cag gct gcg Asp Arg Phe Ile Asn Pro Glu Thr Met Cys Ser Glu Ile Gln Ala Ala	340	345	350	1056
tgt cgg gaa acg gcg caa ccg atc ccg gaa agt gat gct gaa ctg gcg Cys Arg Glu Thr Ala Gln Pro Ile Pro Glu Ser Asp Ala Glu Leu Ala	355	360	365	1104
cgc tgc att ttc gac agt ctg gcg ctg ctg tat gcc gat gtg ttg cat Arg Cys Ile Phe Asp Ser Leu Ala Leu Leu Tyr Ala Asp Val Leu His	370	375	380	1152
gag ctg gcg cag ctg cgc ggt gaa gat ttc tgc caa ctg cat att gtc Glu Leu Ala Gln Leu Arg Gly Glu Asp Phe Ser Gln Leu His Ile Val	385	390	395	400
ggc gga ggc tgc cag aac acg ctg ctc aac cag cta tgc gcc gat gcc Gly Gly Cys Gln Asn Thr Leu Leu Asn Gln Leu Cys Ala Asp Ala	405	410	415	1248
tgc ggt att cgg gtg atc gcc ggg cct gtt gaa gcc tgc acg ctc ggc Cys Gly Ile Arg Val Ile Ala Gly Pro Val Glu Ala Ser Thr Leu Gly	420	425	430	1296
aat atc ggc atc cag tta atg acg ctg gat gaa ctc aac aat gtg gat Asn Ile Gly Ile Gln Leu Met Thr Leu Asp Glu Leu Asn Asn Val Asp	435	440	445	1344
gat ttc cgt cag gtc agc acc acc gcg aat ctg acc acc ttt acc Asp Phe Arg Gln Val Val Ser Thr Thr Ala Asn Leu Thr Phe Thr	450	455	460	1392
cct aat cct gac agt gaa att gcc cac tat gtg gcg cag att cac tct Pro Asn Pro Asp Ser Glu Ile Ala His Tyr Val Ala Gln Ile His Ser	465	470	475	1440
			480	

11

aca cga cag aca aag gag ctt tgc gca tga
Thr Arg Gln Thr Lys Glu Leu Cys Ala
485

1470

<210> 11

<211> 489

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 11

Met Thr Phe Arg Asn Cys Val Ala Val Asp Leu Gly Ala Ser Ser Gly
1 5 10 15

Arg Val Met Leu Ala Arg Tyr Glu Arg Glu Cys Arg Ser Leu Thr Leu
20 25 30

Arg Glu Ile His Arg Phe Asn Asn Gly Leu His Ser Gln Asn Gly Tyr
35 40 45

Val Thr Trp Asp Val Asp Ser Leu Glu Ser Ala Ile Arg Leu Gly Leu
50 55 60

Asn Lys Val Cys Glu Glu Gly Ile Arg Ile Asp Ser Ile Gly Ile Asp
65 70 75 80

Thr Trp Gly Val Asp Phe Val Leu Leu Asp Gln Gln Gly Gln Arg Val
85 90 95

Gly Leu Pro Val Ala Tyr Arg Asp Ser Arg Thr Asn Gly Leu Met Ala
100 105 110

Gln Ala Gln Gln Gln Leu Gly Lys Arg Asp Ile Tyr Gln Arg Ser Gly
115 120 125

Ile Gln Phe Leu Pro Phe Asn Thr Leu Tyr Gln Leu Arg Ala Leu Thr
130 135 140

Glu Gln Gln Pro Glu Leu Ile Pro His Ile Ala His Ala Leu Leu Met
145 150 155 160

Pro Asp Tyr Phe Ser Tyr Arg Leu Thr Gly Lys Met Asn Trp Glu Tyr
165 170 175

Thr Asn Ala Thr Thr Gln Leu Val Asn Ile Asn Ser Asp Asp Trp
180 185 190

Asp Glu Ser Leu Leu Ala Trp Ser Gly Ala Asn Lys Ala Trp Phe Gly
195 200 205

Arg Pro Thr His Pro Gly Asn Val Ile Gly His Trp Ile Cys Pro Gln
210 215 220

Gly Asn Glu Ile Pro Val Val Ala Val Ala Ser His Asp Thr Ala Ser
225 230 235 240

Ala Val Ile Ala Ser Pro Leu Asn Gly Ser Arg Ala Ala Tyr Leu Ser
245 250 255

Ser Gly Thr Trp Ser Leu Met Gly Phe Glu Ser Gln Thr Pro Phe Thr
260 265 270

Asn Asp Thr Ala Leu Ala Ala Asn Ile Thr Asn Glu Gly Gly Ala Glu
275 280 285

Gly Arg Tyr Arg Val Leu Lys Asn Ile Met Gly Leu Trp Leu Leu Gln
290 295 300

Arg Val Leu Gln Glu Gln Gln Ile Asn Asp Leu Pro Ala Leu Ile Ser
305 310 315 320

12

Ala Thr Gln Ala Leu Pro Ala Cys Arg Phe Ile Ile Asn Pro Asn Asp
 325 330 335
 Asp Arg Phe Ile Asn Pro Glu Thr Met Cys Ser Glu Ile Gln Ala Ala
 340 345 350
 Cys Arg Glu Thr Ala Gln Pro Ile Pro Glu Ser Asp Ala Glu Leu Ala
 355 360 365
 Arg Cys Ile Phe Asp Ser Leu Ala Leu Tyr Ala Asp Val Leu His
 370 375 380
 Glu Leu Ala Gln Leu Arg Gly Glu Asp Phe Ser Gln Leu His Ile Val
 385 390 395 400
 Gly Gly Cys Gln Asn Thr Leu Leu Asn Gln Leu Cys Ala Asp Ala
 405 410 415
 Cys Gly Ile Arg Val Ile Ala Gly Pro Val Glu Ala Ser Thr Leu Gly
 420 425 430
 Asn Ile Gly Ile Gln Leu Met Thr Leu Asp Glu Leu Asn Asn Val Asp
 435 440 445
 Asp Phe Arg Gln Val Val Ser Thr Thr Ala Asn Leu Thr Thr Phe Thr
 450 455 460
 Pro Asn Pro Asp Ser Glu Ile Ala His Tyr Val Ala Gln Ile His Ser
 465 470 475 480
 Thr Arg Gln Thr Lys Glu Leu Cys Ala
 485

<210> 12
 <211> 825
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(822)
 <223> coding for rhaD (rhamnulose-phosphate aldolase)
 <400> 12
 atg caa aac att act cag tcc tgg ttt gtc cag gga atg atc aaa gcc 48
 Met Gln Asn Ile Thr Gln Ser Trp Phe Val Gln Gly Met Ile Lys Ala
 1 5 10 15
 acc acc gac gcc tgg ctg aaa ggc tgg gat gag cgc aac ggc ggc aac 96
 Thr Thr Asp Ala Trp Leu Lys Gly Trp Asp Glu Arg Asn Gly Asn
 20 25 30
 ctg acg cta cgc ctg gat gac gcc gat atc gca cca tat cac gac aat 144
 Leu Thr Leu Arg Leu Asp Asp Ala Asp Ile Ala Pro Tyr His Asp Asn
 35 40 45
 ttc cac caa caa ccg cgc tat atc ccg ctc agc cag ccc atg cct tta 192
 Phe His Gln Gln Pro Arg Tyr Ile Pro Leu Ser Gln Pro Met Pro Leu
 50 55 60
 ctg gca aat aca ccg ttt att gtc acc ggc tcg ggc aaa ttc ttc cgt 240
 Leu Ala Asn Thr Pro Phe Ile Val Thr Gly Ser Gly Lys Phe Phe Arg
 65 70 75 80
 aac gtc cag ctt gat cct gcg gct aac tta ggc atc gta aaa gtc gac 288
 Asn Val Gln Leu Asp Pro Ala Ala Asn Leu Gly Ile Val Lys Val Asp
 85 90 95

13

agc gac ggc gcg ggc tac cac att ctt tgg ggg tta acc aac gaa gcc 336
 Ser Asp Gly Ala Gly Tyr His Ile Leu Trp Gly Leu Thr Asn Glu Ala
 100 105 110
 gtc ccc act tcc gaa ctt ccg gct cac ttc ctt tcc cac tgc gag cgc 384
 Val Pro Thr Ser Glu Leu Pro Ala His Phe Leu Ser His Cys Glu Arg
 115 120 125
 att aaa gcc acc aac ggc aaa gat cggtgtc atc atg cac tgc cac gcc 432
 Ile Lys Ala Thr Asn Gly Lys Asp Arg Val Ile Met His Cys His Ala
 130 135 140
 acc aac ctg atc gcc ctc acc tat gta ctt gaa aac gac acc gcc gtc 480
 Thr Asn Leu Ile Ala Leu Thr Tyr Val Leu Glu Asn Asp Thr Ala Val
 145 150 155 160
 ttc act cgc caa ctg tgg gaa ggc agc acc gag tgt ctg gtgtgtc ttc 528
 Phe Thr Arg Gln Leu Trp Glu Gly Ser Thr Glu Cys Leu Val Val Phe
 165 170 175
 ccg gat ggc gtt ggc att ttg ccg tgg atg gtgtccc ggc acg gac gaa 576
 Pro Asp Gly Val Gly Ile Leu Pro Trp Met Val Pro Gly Thr Asp Glu
 180 185 190
 atc ggc cag gcg acc gca caa gag atg caa aaa cat tcg ctg gtgttgc 624
 Ile Gly Gln Ala Thr Ala Gln Glu Met Gln Lys His Ser Leu Val Leu
 195 200 205
 tgg ccc ttc cac ggc gtc ttc ggc agc gga ccg acg ctg gat gaa acc 672
 Trp Pro Phe His Gly Val Phe Gly Ser Gly Pro Thr Leu Asp Glu Thr
 210 215 220
 ttc ggt tta atc gac acc gca gaa aaa tca gca caa gta tta gtg aag 720
 Phe Gly Leu Ile Asp Thr Ala Glu Lys Ser Ala Gln Val Leu Val Lys
 225 230 235 240
 gtt tat tcg atg ggc ggc atg aaa cag acc atc agc cgt gaa gag ttg 768
 Val Tyr Ser Met Gly Gly Met Lys Gln Thr Ile Ser Arg Glu Glu Leu
 245 250 255
 ata gcg ctc ggc aag cgt ttc ggc gtt acg cca ctc gcc agt gcg ctg 816
 Ile Ala Leu Gly Lys Arg Phe Gly Val Thr Pro Leu Ala Ser Ala Leu
 260 265 270
 gcg ctg taa 825
 Ala Leu
 <210> 13
 <211> 274
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli
 <400> 13
 Met Gln Asn Ile Thr Gln Ser Trp Phe Val Gln Gly Met Ile Lys Ala
 1 5 10 15
 Thr Thr Asp Ala Trp Leu Lys Gly Trp Asp Glu Arg Asn Gly Gly Asn
 20 25 30
 Leu Thr Leu Arg Leu Asp Asp Ala Asp Ile Ala Pro Tyr His Asp Asn
 35 40 45
 Phe His Gln Gln Pro Arg Tyr Ile Pro Leu Ser Gln Pro Met Pro Leu
 50 55 60
 Leu Ala Asn Thr Pro Phe Ile Val Thr Gly Ser Gly Lys Phe Phe Arg
 65 70 75 80

14

Asn	Val	Gln	Leu	Asp	Pro	Ala	Ala	Asn	Leu	Gly	Ile	Val	Lys	Val	Asp
				85							90				95
Ser	Asp	Gly	Ala	Gly	Tyr	His	Ile	Leu	Trp	Gly	Leu	Thr	Asn	Glu	Ala
				100					105						110
Val	Pro	Thr	Ser	Glu	Leu	Pro	Ala	His	Phe	Leu	Ser	His	Cys	Glu	Arg
				115					120						125
Ile	Lys	Ala	Thr	Asn	Gly	Lys	Asp	Arg	Val	Ile	Met	His	Cys	His	Ala
				130			135				140				
Thr	Asn	Leu	Ile	Ala	Leu	Thr	Tyr	Val	Leu	Glu	Asn	Asp	Thr	Ala	Val
				145			150			155					160
Phe	Thr	Arg	Gln	Leu	Trp	Glu	Gly	Ser	Thr	Glu	Cys	Leu	Val	Val	Phe
				165			170								175
Pro	Asp	Gly	Val	Gly	Ile	Leu	Pro	Trp	Met	Val	Pro	Gly	Thr	Asp	Glu
				180			185								190
Ile	Gly	Gln	Ala	Thr	Ala	Gln	Glu	Met	Gln	Lys	His	Ser	Leu	Val	Leu
				195			200								205
Trp	Pro	Phe	His	Gly	Val	Phe	Gly	Ser	Gly	Pro	Thr	Leu	Asp	Glu	Thr
				210			215								220
Phe	Gly	Leu	Ile	Asp	Thr	Ala	Glu	Lys	Ser	Ala	Gln	Val	Leu	Val	Lys
				225			230								240
Val	Tyr	Ser	Met	Gly	Gly	Met	Lys	Gln	Thr	Ile	Ser	Arg	Glu	Glu	Leu
				245			250								255
Ile	Ala	Leu	Gly	Lys	Arg	Phe	Gly	Val	Thr	Pro	Leu	Ala	Ser	Ala	Leu
				260			265								270
Ala	Leu														

<210> 14
<211> 939
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(936)
<223> coding for rhaR (positive regulator for rhaRS operon)
<400> 14
atg gct ttc tgc aat aac gcg aat ctt ctc aac gta ttt gta cgccat 48
Met Ala Phe Cys Asn Asn Ala Asn Leu Leu Asn Val Phe Val Arg His
1 5 10 15
att gcg aat aat caa ctt cgt tct ctg gcc gag gta gcc acg gtg gcg 96
Ile Ala Asn Asn Gln Leu Arg Ser Leu Ala Glu Val Ala Thr Val Ala
20 25 30
cat cag tt aaaa ctt ctc aaaa gat gat ttt ttt gcc agc gac cag cag 144
His Gln Leu Lys Leu Lys Asp Asp Phe Phe Ala Ser Asp Gln Gln
35 40 45
gca gtc gct gtg gct gac cgt tat ccg caa gat gtc ttt gct gaa cat 192
Ala Val Ala Val Ala Asp Arg Tyr Pro Gln Asp Val Phe Ala Glu His
50 55 60

15

aca cat gat ttt tgt gag ctg gtg att gtc tgg cgc ggt aat ggc ctg.	240
Thr His Asp Phe Cys Glu Leu Val Ile Val Trp Arg Gly Asn Gly Leu	
65 70 75 80	
cat gta ctc aac gat cgc cct tat cgc att acc cgt ggc gat ctc ttt	288
His Val Leu Asn Asp Arg Pro Tyr Arg Ile Thr Arg Gly Asp Leu Phe	
85 90 95	
tac att cat gct gac gat aaa cac tcc tac gct tcc gtt aac gat ctg	336
Tyr Ile His Ala Asp Asp Lys His Ser Tyr Ala Ser Val Asn Asp Leu	
100 105 110	
gtt ttg cag aat att att tat tgc ccg gag cgt ctg aag ctg aat ctt	384
Val Leu Gln Asn Ile Ile Tyr Cys Pro Glu Arg Leu Lys Leu Asn Leu	
115 120 125	
gac tgg cag ggg gcg att ccg gga ttt aac gcc agc gca ggg caa cca	432
Asp Trp Gln Gly Ala Ile Pro Gly Phe Asn Ala Ser Ala Gly Gln Pro	
130 135 140	
cac tgg cgc tta ggt agc atg ggg atg gcg cag gcg cgg cag gtt atc	480
His Trp Arg Leu Gly Ser Met Gly Met Ala Gln Ala Arg Gln Val Ile	
145 150 155 160	
ggt cag ctt gag cat gaa agt agt cag cat gtg ccg ttt gct aac gaa	528
Gly Gln Leu Glu His Glu Ser Ser Gln His Val Pro Phe Ala Asn Glu	
165 170 175	
atg gct gag ttg ctg ttc ggg cag ttg gtg atg ttg ctg aat cgc cat	576
Met Ala Glu Leu Leu Phe Gly Gln Leu Val Met Leu Leu Asn Arg His	
180 185 190	
cgt tac acc agt gat tcg ttg ccg cca aca tcc agc gaa acg ttg ctg	624
Arg Tyr Thr Ser Asp Ser Leu Pro Pro Thr Ser Ser Glu Thr Leu Leu	
195 200 205	
gat aag ctg att acc cgg ctg gcg gct agc ctg aaa agt ccc ttt gcg	672
Asp Lys Leu Ile Thr Arg Leu Ala Ala Ser Leu Lys Ser Pro Phe Ala	
210 215 220	
ctg gat aaa ttt tgt gat gag gca tcg tgc agt gag cgc gtt ttg cgt.	720
Leu Asp Lys Phe Cys Asp Glu Ala Ser Cys Ser Glu Arg Val Leu Arg	
225 230 235 240	
cag caa ttt cgc cag cag act gga atg acc atc aat caa tat ctg cga	768
Gln Gln Phe Arg Gln Gln Thr Gly Met Thr Ile Asn Gln Tyr Leu Arg	
245 250 255	
cag gtc aga gtg tgt cat gcg caa tat ctt ctc cag cat agc cgc ctg	816
Gln Val Arg Val Cys His Ala Gln Tyr Leu Leu Gln His Ser Arg Leu	
260 265 270	
tta atc agt gat att tcg acc gaa tgt ggc ttt gaa gat agt aac tat	864
Leu Ile Ser Asp Ile Ser Thr Glu Cys Gly Phe Glu Asp Ser Asn Tyr	
275 280 285	
ttt tcg gtg gtg ttt acc cgg gaa acc ggg atg acg ccc agc cag tgg	912
Phe Ser Val Val Phe Thr Arg Glu Thr Gly Met Thr Pro Ser Gln Trp	
290 295 300	
cgt cat ctc aat tcg cag aaa gat taa	939
Arg His Leu Asn Ser Gln Lys Asp	
305 310	

16

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 15

Met Ala Phe Cys Asn Asn Ala Asn Leu Leu Asn Val Phe Val Arg His
1 5 10 15

Ile Ala Asn Asn Gln Leu Arg Ser Leu Ala Glu Val Ala Thr Val Ala
20 25 30

His Gln Leu Lys Leu Leu Lys Asp Asp Phe Phe Ala Ser Asp Gln Gln
35 40 45

Ala Val Ala Val Ala Asp Arg Tyr Pro Gln Asp Val Phe Ala Glu His
50 55 60

Thr His Asp Phe Cys Glu Leu Val Ile Val Trp Arg Gly Asn Gly Leu
65 70 75 80

His Val Leu Asn Asp Arg Pro Tyr Arg Ile Thr Arg Gly Asp Leu Phe
85 90 95

Tyr Ile His Ala Asp Asp Lys His Ser Tyr Ala Ser Val Asn Asp Leu
100 105 110

Val Leu Gln Asn Ile Ile Tyr Cys Pro Glu Arg Leu Lys Leu Asn Leu
115 120 125

Asp Trp Gln Gly Ala Ile Pro Gly Phe Asn Ala Ser Ala Gly Gln Pro
130 135 140

His Trp Arg Leu Gly Ser Met Gly Met Ala Gln Ala Arg Gln Val Ile
145 150 155 160

Gly Gln Leu Glu His Glu Ser Ser Gln His Val Pro Phe Ala Asn Glu
165 170 175

Met Ala Glu Leu Leu Phe Gly Gln Leu Val Met Leu Leu Asn Arg His
180 185 190

Arg Tyr Thr Ser Asp Ser Leu Pro Pro Thr Ser Ser Glu Thr Leu Leu
195 200 205

Asp Lys Leu Ile Thr Arg Leu Ala Ala Ser Leu Lys Ser Pro Phe Ala
210 215 220

Leu Asp Lys Phe Cys Asp Glu Ala Ser Cys Ser Glu Arg Val Leu Arg
225 230 235 240

Gln Gln Phe Arg Gln Gln Thr Gly Met Thr Ile Asn Gln Tyr Leu Arg
245 250 255

Gln Val Arg Val Cys His Ala Gln Tyr Leu Leu Gln His Ser Arg Leu
260 265 270

Leu Ile Ser Asp Ile Ser Thr Glu Cys Gly Phe Glu Asp Ser Asn Tyr
275 280 285

Phe Ser Val Val Phe Thr Arg Glu Thr Gly Met Thr Pro Ser Gln Trp
290 295 300

Arg His Leu Asn Ser Gln Lys Asp
305 310

<210> 16

<211> 837

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(834)
 <223> coding for rhaS (positive regulator of rhaBAD operon)
 <400> 16
 atg acc gta tta cat agt gtg gat ttt ttt ccg tct ggt aac gcc tcc 48
 Met Thr Val Leu His Ser Val Asp Phe Phe Pro Ser Gly Asn Ala Ser
 1 5 10 15
 gtg gcg ata gaa ccc cgg ctc ccg cag gcg gat ttt cct gaa cat cat 96
 Val Ala Ile Glu Pro Arg Leu Pro Gln Ala Asp Phe Pro Glu His His
 20 25 30
 cat gat ttt cat gaa att gtg att gtc gaa cat ggc acg ggt att cat 144
 His Asp Phe His Glu Ile Val Ile Val Glu His Gly Thr Gly Ile His
 35 40 45
 gtg ttt aat ggg cag ccc tat acc atc acc ggt ggc acg gtc tgt ttc 192
 Val Phe Asn Gly Gln Pro Tyr Thr Gly Gly Thr Val Cys Phe
 50 55 60
 gta cgc gat cat gat cgg cat ctg tat gaa cat acc gat aat ctg tgt 240
 Val Arg Asp His Asp Arg His Leu Tyr Glu His Thr Asp Asn Leu Cys
 65 70 75 80
 ctg acc aat gtg ctg tat cgc tcg ccg gat cga ttt cag ttt ctc gcc 288
 Leu Thr Asn Val Leu Tyr Arg Ser Pro Asp Arg Phe Gln Phe Leu Ala
 85 90 95
 ggg ctg aat cag ttg ctg cca caa gag ctg gat ggg cag tat ccg tct 336
 Gly Leu Asn Gln Leu Pro Gln Glu Leu Asp Gly Gln Tyr Pro Ser
 100 105 110
 cac tgg cgc gtt aac cac agc gta ttg cag cag gtg cga cag ctg gtt 384
 His Trp Arg Val Asn His Ser Val Leu Gln Gln Val Arg Gln Leu Val
 115 120 125
 gca cag atg gaa cag cag gaa aat gat tta ccc tcg acc gcc 432
 Ala Gln Met Glu Gln Gln Glu Gly Glu Asn Asp Leu Pro Ser Thr Ala
 130 135 140
 agt cgc gag atc ttg ttt atg caa tta ctg ctc ttg ctg cgt aaa agc 480
 Ser Arg Glu Ile Leu Phe Met Gln Leu Leu Leu Leu Arg Lys Ser
 145 150 155 160
 agt ttg cag gag aac ctg gaa aac agc gca tca cgt ctc aac ttg ctt 528
 Ser Leu Gln Glu Asn Leu Glu Asn Ser Ala Ser Arg Leu Asn Leu Leu
 165 170 175
 ctg gcc tgg ctg gag gac cat ttt gcc gat gag gtg aat tgg gat gcc 576
 Leu Ala Trp Leu Glu Asp His Phe Ala Asp Glu Val Asn Trp Asp Ala
 180 185 190
 gtg gcg gat caa ttt tct ctt tca ctg cgt acg cta cat cgg cag ctt 624
 Val Ala Asp Gln Phe Ser Leu Ser Leu Arg Thr Leu His Arg Gln Leu
 195 200 205
 aag cag caa acg gga ctg acg cct cag cga tac ctg aac cgc ctg cga 672
 Lys Gln Gln Thr Gly Leu Thr Pro Gln Arg Tyr Leu Asn Arg Leu Arg
 210 215 220
 ctg atg aaa gcc cga cat ctg cta cgc cac agc gag gcc agc gtt act 720
 Leu Met Lys Ala Arg His Leu Leu Arg His Ser Glu Ala Ser Val Thr
 225 230 235 240

gac atc gcc tat cgc tgt gga ttc agc gac agt aac cac ttt tcg acg 768
 Asp Ile Ala Tyr Arg Cys Gly Phe Ser Asp Ser Asn His Phe Ser Thr
 245 250 255
 ctt ttt cgc cga gag ttt aac tgg tca ccg cgt gat att cgc cag gga 816
 Leu Phe Arg Arg Glu Phe Asn Trp Ser Pro Arg Asp Ile Arg Gln Gly
 260 265 270
 cg^g gat ggc ttt ctg caa taa 837
 Arg Asp Gly Phe Leu Gln
 275
 <210> 17
 <211> 278
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli
 <400> 17
 Met Thr Val Leu His Ser Val Asp Phe Phe Pro Ser Gly Asn Ala Ser
 1 5 10 15
 Val Ala Ile Glu Pro Arg Leu Pro Gln Ala Asp Phe Pro Glu His His
 20 25 30
 His Asp Phe His Glu Ile Val Ile Val Glu His Gly Thr Gly Ile His
 35 40 45
 Val Phe Asn Gly Gln Pro Tyr Thr Ile Thr Gly Gly Thr Val Cys Phe
 50 55 60
 Val Arg Asp His Asp Arg His Leu Tyr Glu His Thr Asp Asn Leu Cys
 65 70 75 80
 Leu Thr Asn Val Leu Tyr Arg Ser Pro Asp Arg Phe Gln Phe Leu Ala
 85 90 95
 Gly Leu Asn Gln Leu Leu Pro Gln Glu Leu Asp Gly Gln Tyr Pro Ser
 100 105 110
 His Trp Arg Val Asn His Ser Val Leu Gln Gln Val Arg Gln Leu Val
 115 120 125
 Ala Gln Met Glu Gln Gln Glu Gly Glu Asn Asp Leu Pro Ser Thr Ala
 130 135 140
 Ser Arg Glu Ile Leu Phe Met Gln Leu Leu Leu Leu Arg Lys Ser
 145 150 155 160
 Ser Leu Gln Glu Asn Leu Glu Asn Ser Ala Ser Arg Leu Asn Leu Leu
 165 170 175
 Leu Ala Trp Leu Glu Asp His Phe Ala Asp Glu Val Asn Trp Asp Ala
 180 185 190
 Val Ala Asp Gln Phe Ser Leu Ser Leu Arg Thr Leu His Arg Gln Leu
 195 200 205
 Lys Gln Gln Thr Gly Leu Thr Pro Gln Arg Tyr Leu Asn Arg Leu Arg
 210 215 220
 Leu Met Lys Ala Arg His Leu Leu Arg His Ser Glu Ala Ser Val Thr
 225 230 235 240
 Asp Ile Ala Tyr Arg Cys Gly Phe Ser Asp Ser Asn His Phe Ser Thr
 245 250 255
 Leu Phe Arg Arg Glu Phe Asn Trp Ser Pro Arg Asp Ile Arg Gln Gly
 260 265 270

Arg Asp Gly Phe Leu Gln
275

<210> 18
 <211> 1035
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1032)
 <223> coding for rhaT (rhamnose transport protein).
 <400> 18

atg	agt	aac	gct	att	acg	atg	ggg	ata	ttt	tgg	cat	ttg	atc	ggc	gct	48
Met	Ser	Asn	Ala	Ile	Thr	Met	Gly	Ile	Phe	Trp	His	Leu	Ile	Gly	Ala	
1	5														15	
gcc	agt	gca	gcc	tgt	ttt	tac	gct	ccg	ttc	aaa	aaa	gta	aaa	aaa	tgg	96
Ala	Ser	Ala	Ala	Cys	Phe	Tyr	Ala	Pro	Phe	Lys	Lys	Val	Lys	Lys	Trp	
															30	
20									25							
tca	tgg	gaa	acc	atg	tgg	tca	gtc	ggt	ggg	att	gtt	tcg	tgg	att	att	144
Ser	Trp	Glu	Thr	Met	Trp	Ser	Val	Gly	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Ile	Ile	
															45	
35								40								
ctg	ccg	tgg	gcc	atc	agc	gcc	ctg	tta	cta	ccg	aat	ttc	tgg	gct	tat	192
Leu	Pro	Trp	Ala	Ile	Ser	Ala	Leu	Leu	Leu	Pro	Asn	Phe	Trp	Ala	Tyr	
50								55					60			
tac	agc	tcg	ttt	agt	ctc	tct	acg	cga	ctg	cct	gtt	ttt	ctg	ttc	ggc	240
Tyr	Ser	Ser	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Arg	Leu	Pro	Val	Phe	Leu	Phe	Gly	
65								70					75		80	
gct	atg	tgg	ggg	atc	ggt	aat	atc	aac	tac	ggc	ctg	acc	atg	cgt	tat	288
Ala	Met	Trp	Gly	Ile	Gly	Asn	Ile	Asn	Tyr	Gly	Leu	Thr	Met	Arg	Tyr	
								85			90			95		
ctc	ggc	atg	tcg	atg	gga	att	ggc	atc	gcc	att	ggc	att	acg	ttg	att	336
Leu	Gly	Met	Ser	Met	Gly	Ile	Gly	Ile	Ala	Ile	Gly	Ile	Thr	Leu	Ile	
100								105					110			
gtc	ggt	acg	ctg	atg	acg	cca	att	atc	aac	ggc	aat	ttc	gat	gtg	tgg	384
Val	Gly	Thr	Leu	Met	Thr	Ile	Ile	Asn	Gly	Asn	Phe	Asp	Val	Leu		
115								120					125			
att	agc	acc	gaa	ggc	gga	ccg	atg	acg	ttg	ctc	ggc	gtt	ctg	gtg	gct	432
Ile	Ser	Thr	Glu	Gly	Gly	Arg	Met	Thr	Leu	Leu	Gly	Val	Leu	Val	Ala	
130								135					140			
ctg	att	ggc	gta	ggg	att	gta	act	ccg	gcc	ggg	cag	ttg	aaa	gag	ccg	480
Leu	Ile	Gly	Val	Gly	Ile	Val	Thr	Arg	Ala	Gly	Gln	Leu	Lys	Glu	Arg	
145								150			155			160		
aag	atg	ggc	att	aaa	gcc	gaa	gag	ttc	aat	ctg	aaa	aaa	ggg	ctg	gtg	528
Lys	Met	Gly	Ile	Lys	Ala	Glu	Glu	Phe	Asn	Leu	Lys	Lys	Gly	Leu	Val	
															165	
165													170		175	
ctg	gct	gtg	atg	tgc	ggc	att	ttc	tct	gcc	ggg	atg	tcc	ttt	gct	atg	576
Leu	Ala	Val	Met	Cys	Gly	Ile	Phe	Ser	Ala	Gly	Met	Ser	Phe	Ala	Met	
180								185					190			
aac	gcc	gca	aaa	ccg	atg	cat	gaa	gcc	gct	gcc	gca	ctt	ggc	gtc	gat	624
Asn	Ala	Ala	Lys	Pro	Met	His	Glu	Ala	Ala	Ala	Leu	Gly	Val	Asp		
195								200					205			

20

cca ctg tat gtc gct ctg cca agc tat gtt gtc atc atg ggc ggc ggc 672
 Pro Leu Tyr Val Ala Leu Pro Ser Tyr Val Val Ile Met Gly Gly Gly
 210 215 220
 gcg atc att aac ctc ggt ttc tgt ttt att cgt ctg gca aaa gtg aag 720
 Ala Ile Ile Asn Leu Gly Phe Cys Phe Ile Arg Leu Ala Lys Val Lys
 225 230 235 240
 gat ttg tcg cta aaa gcc gac ttc tcg ctg gca aaa tcg ctg atc att 768
 Asp Leu Ser Leu Lys Ala Asp Phe Ser Leu Ala Lys Ser Leu Ile Ile
 245 250 255
 cac aat gtg tta ctc tcg aca ctg ggc ggg ttg atg tgg tat ctg caa 816
 His Asn Val Leu Leu Ser Thr Leu Gly Gly Leu Met Trp Tyr Leu Gln
 260 265 270
 ttc ttt ttc tat gcc tgg ggc cac gcc cgc att ccg gcg cag tat gac 864
 Phe Phe Tyr Ala Trp Gly His Ala Arg Ile Pro Ala Gln Tyr Asp
 275 280 285
 tac atc agt tgg atg ctg cat atg agt ttc tat gta ttg tgc ggc ggt 912
 Tyr Ile Ser Trp Met Leu His Met Ser Phe Tyr Val Leu Cys Gly Gly
 290 295 300
 atc gtc ggg ctg gtg ctg aaa gag tgg aac aat gca gga cgc cgt ccg 960
 Ile Val Gly Leu Val Leu Lys Glu Trp Asn Asn Ala Gly Arg Arg Pro
 305 310 315 320
 gta acg gtg ttg agc ctc ggt tgt gtg att att gtc gcc gct aac 1008
 Val Thr Val Leu Ser Leu Gly Cys Val Val Ile Ile Val Ala Ala Asn
 325 330 335
 atc gtc ggc atc ggc atg gcg aat taa 1035
 Ile Val Gly Ile Gly Met Ala Asn
 340
 <210> 19
 <211> 344
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli
 <400> 19
 Met Ser Asn Ala Ile Thr Met Gly Ile Phe Trp His Leu Ile Gly Ala
 1 5 10 15
 Ala Ser Ala Ala Cys Phe Tyr Ala Pro Phe Lys Lys Val Lys Lys Trp
 20 25 30
 Ser Trp Glu Thr Met Trp Ser Val Gly Gly Ile Val Ser Trp Ile Ile
 35 40 45
 Leu Pro Trp Ala Ile Ser Ala Leu Leu Leu Pro Asn Phe Trp Ala Tyr
 50 55 60
 Tyr Ser Ser Phe Ser Leu Ser Thr Arg Leu Pro Val Phe Leu Phe Gly
 65 70 75 80
 Ala Met Trp Gly Ile Gly Asn Ile Asn Tyr Gly Leu Thr Met Arg Tyr
 85 90 95
 Leu Gly Met Ser Met Gly Ile Gly Ile Ala Ile Gly Ile Thr Leu Ile
 100 105 110
 Val Gly Thr Leu Met Thr Pro Ile Ile Asn Gly Asn Phe Asp Val Leu
 115 120 125
 Ile Ser Thr Glu Gly Gly Arg Met Thr Leu Leu Gly Val Leu Val Ala
 130 135 140

21

Leu Ile Gly Val Gly Ile Val Thr Arg Ala Gly Gln Leu Lys Glu Arg
145 150 155 160
Lys Met Gly Ile Lys Ala Glu Glu Phe Asn Leu Lys Lys Gly Leu Val
165 170 175
Leu Ala Val Met Cys Gly Ile Phe Ser Ala Gly Met Ser Phe Ala Met
180 185 190
Asn Ala Ala Lys Pro Met His Glu Ala Ala Ala Ala Leu Gly Val Asp
195 200 205
Pro Leu Tyr Val Ala Leu Pro Ser Tyr Val Val Ile Met Gly Gly Gly
210 215 220
Ala Ile Ile Asn Leu Gly Phe Cys Phe Ile Arg Leu Ala Lys Val Lys
225 230 235 240
Asp Leu Ser Leu Lys Ala Asp Phe Ser Leu Ala Lys Ser Leu Ile Ile
245 250 255
His Asn Val Leu Leu Ser Thr Leu Gly Gly Leu Met Trp Tyr Leu Gln
260 265 270
Phe Phe Phe Tyr Ala Trp Gly His Ala Arg Ile Pro Ala Gln Tyr Asp
275 280 285
Tyr Ile Ser Trp Met Leu His Met Ser Phe Tyr Val Leu Cys Gly Gly
290 295 300
Ile Val Gly Leu Val Leu Lys Glu Trp Asn Asn Ala Gly Arg Arg Pro
305 310 315 320
Val Thr Val Leu Ser Leu Gly Cys Val Val Ile Ile Val Ala Ala Asn
325 330 335
Ile Val Gly Ile Gly Met Ala Asn
340

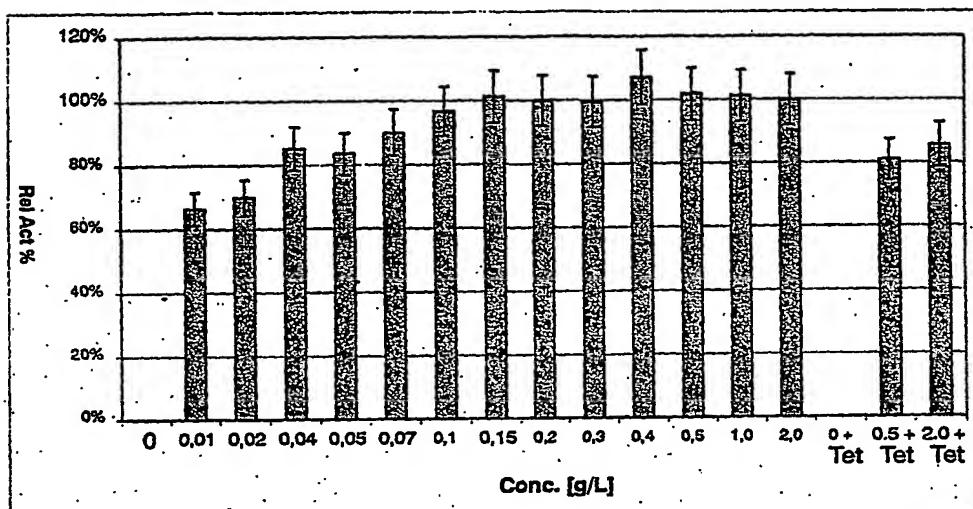
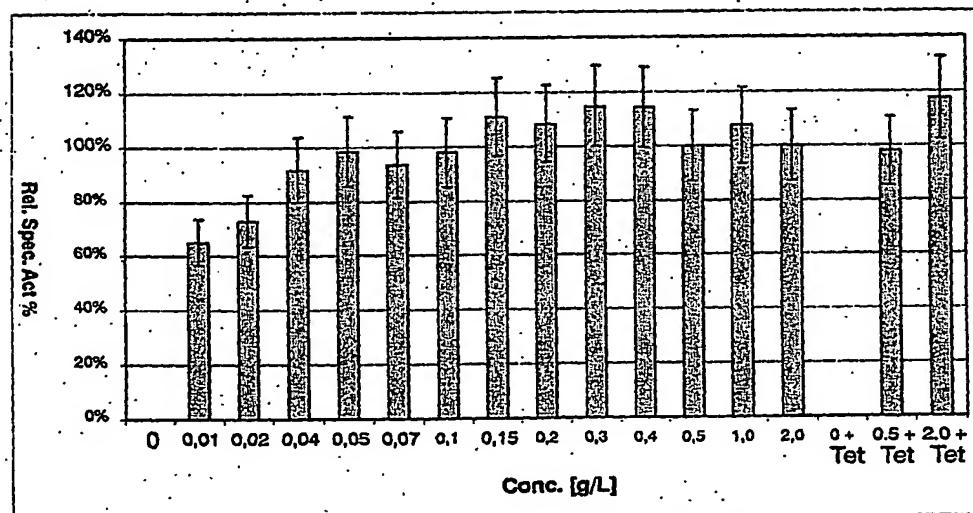
A**B**

Fig. 1

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.